

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**Національний авіаційний університет**

## **МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ**

Лабораторний практикум  
для студентів спеціальності 6.051401 «Біотехнологія»

Київ 2016

УДК 577.27(076.5)  
ББК М 545 Р 27 я 7  
М 545

Укладачі: *С. І. Тарасюк, О. А. Васильченко, Ю. М. Глушко*

Рецензент: *І.В. Матвєєва*

*Затверджено методичною редакційною радою Національного авіаційного університету (протокол № 3/15 від 21.05.2015 р.).*

М 545 Лабораторний практикум «Молекулярна біотехнологія»: уклад.: *С. І. Тарасюк, О. А. Васильченко, Ю. М. Глушко.* – К.: НАУ, 2016. – 52 с.

Практикум «Молекулярна біотехнологія» містить методики виконання лабораторних робіт з курсу «Молекулярна біотехнологія», коротке теоретичне обґрунтування кожного дослідження, а також контрольні запитання з теоретичної та практичної частин.

Для студентів зі спеціальності 6.051401 «Біотехнологія».

## ВСТУП

Основною метою лабораторного практикуму «Молекулярна біотехнологія» є закріплення й поглиблення знань студентів, удосконалення практичних навичок роботи в лабораторії, опанування сучасних методів молекулярної біотехнології, дослідження із застосуванням біологічних об'єктів з метою можливого подальшого впровадження у біотехнологічне виробництво або використання в науковій роботі.

Практикум містить вказівки до виконання лабораторних робіт студентами. Під час виконання запропонованих дослідів студенти вдосконалюють володіння методами молекулярної біотехнології, експериментальних досліджень, набувають уміння аналізувати отримані результати.

Окремий розділ стосується правил техніки безпеки під час роботи у лабораторії.

Практикум містить матеріал до двох модулів дисципліни: перший модуль – «Основи молекулярної біотехнології»; другий модуль – «Нанобіотехнологія». Виконання лабораторних робіт дає можливість опанувати сучасні методи молекулярної біотехнології.

## ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

1. У науково-дослідній лабораторії мають бути наявні протипожежні засоби (вогнегасник, пісок, вода), аптечка для надання першої медичної допомоги та засоби особистого захисту (гумові рукавички, захисні окуляри та ін).

2. У лабораторії заборонено вживати їжу, палити.

3. Працювати необхідно в спецодязі (халатах). Упродовж робіт з великими об'ємами концентрованих кислот та під час їх наливання доцільно додатково використовувати захисні окуляри.

4. Після роботи з реактивами слід помити руки, а після роботи з токсичними сполуками – помити руки, почистити зуби, промити ротovu порожнину, змінити одяг.

5. Усі реактиви мають бути у зразковому стані відповідно до вимог зберігання.

6. Отруйні та вибухонебезпечні речовини слід зберігати у сейфі.

7. Під час роботи з реактивами не можна торкатися обличчя, очей та відкритих ділянок шкіри.

8. Роботи, пов'язані з виділенням газів, мають проводитись лише під витяжною шафою.

9. Заборонено пробувати реактиви на смак, вдихати леткі речовини – вони можуть бути отруйними.

10. Відбирати розчини потрібно піпетками, використовуючи спеціальні пристосування з гумовими грушами або дозатори.

11. Для приготування розчинів речовини слід відбирати шпателем, кількісно переносити їх у мірні склянки чи колби. Готові реактиви повинні зберігатися в закритому посуді з етикетками, на яких позначена назва, концентрацію та дату приготування.

12. Перед проведенням досліджень необхідно ретельно вивчити методику та підготувати робоче місце.

13. Перед використанням приладів слід детально ознайомитися з інструкцією.

14. Необхідно дотримуватись правил техніки безпеки під час роботи з електроприладами та обладнанням.

15. У разі потрапляння на шкіру кислот чи лугів уражені ділянки слід негайно промити великою кількістю (струменем) води.

# МОДУЛЬ I. ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

## Лабораторна робота 1

### Мікрометод культивування лімфоцитів периферійної крові для хромосомного аналізу

**Мета роботи** – отримати культуру клітин периферійної крові людини, приготувати метафазні пластинки для хромосомного аналізу.

### Завдання роботи

1. Приготувати стерильне поживне середовище для культивування лімфоцитів периферійної крові людини.
2. Отримати навички культивування клітин у стерильних умовах.
3. Приготувати хромосомні препарати та виконати їх фарбування.
4. Дослідити каріотип людини під мікроскопом та скласти каріограму.

### Основні теоретичні відомості

**Цитогенетичний аналіз (метод хромосомного аналізу)** ґрунтується на дослідженні структури і кількості хромосом з використанням мікроскопії, який дозволяє записувати діагноз спадкового захворювання у вигляді каріотипової формули.

**Каріотип** – це специфічний для кожного виду організмів набір хромосом, який характеризується певною кількістю хромосом та особливістю їхньої будови. Зовнішній вигляд хромосом істотно змінюється протягом клітинного циклу: у інтерфазі хромосоми деспіралізовані (ниткоподібні) та локалізовані в ядрі.

Для визначення каріотипу використовують клітини в одній із стадій їх поділу – **метафазі мітозу**, оскільки на даному етапі клітинного поділу хромосоми максимально спіралізовані, вкорочені, потовщені та знаходяться в екваторіальній зоні клітини. Для визначення каріотипу людини зазвичай використовують або одноядерні лімфоцити, виділені з проб крові, поділ яких стимулюють

додаванням мітогенів, або культури клітин, що активно діляться в нормі (фібробласти шкіри, клітини кісткового мозку). Збагачення популяції клітинної культури проводять зупиненням поділу клітин на стадії метафази мітозу додаванням **колхіцину** – алкалоїду, що блокує утворення мікротрубочок веретен поділу і розходження хромосом до полюсів і тим самим перешкоджає завершенню мітозу.

Для систематизування цитогенетичних описів розроблена Міжнародна цитогенетична номенклатура (*International System for Cytogenetic Nomenclature, ISCN*), що практикується на диференційному забарвленні хромосом, яка дозволяє докладно описати окремі хромосоми та їх ділянки. Запис має такий вигляд:

[Кількість хромосом], [статеві хромосоми], [номер хромосоми], [плече], [номер ділянки], [номер смуги]. Наприклад, каріотип людини записується наступним чином: 46,XX (жіночий) та 46,XY (чоловічий) (рис. 1).

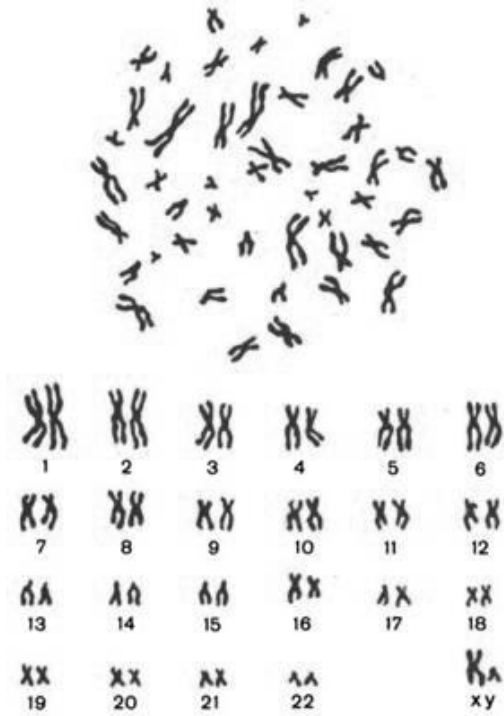


Рис. 1. Нормальний каріотип чоловіка

Довге плече хромосоми позначають літерою **q**, коротке – літерою **p**, **FN** – фундаментальне число сумарної кількості хромосомних плечей; **2n** – диплоїдний набір хромосом.

Порушення нормального каріотипу у людини виникають на ранніх стадіях розвитку організму і, як правило, супроводжуються множинними вадами розвитку. Більшість таких аномалій несумісні з життям. Встановлено, що хромосомні аномалії викликають половину мимовільних викиднів та 5 – 7 % мертвонароджень. Однак, досить велика кількість дітей (близько 6 %) мають вроджені та спадкові хвороби.

### **Обладнання, прилади та матеріали**

Бокс з бактерицидною лампою; холодильник; термостат на 37 °С; центрифуга на 3 000 об/хв; скарифікатори; мікропіпетки; піпетки градузовані на 1, 10 і 20 мл; стерильні пеніцилінові флакони з корками, закріпленими клейкою стрічкою; центрифужні пробірки; предметні скельця; поживне середовище Хенкса (середовище № 199); фітогемаглютинін (ФГА); 0,02 %-й розчин колхіцину в фізіологічному розчині; гіпотонічний розчин (0,075 М розчин КСІ або 0,44 %-й розчин тризаміщеного цитрату натрію); суміш етилового спирту з оцтовою кислотою (3:1); цільна інактивована сироватка великої рогатої худоби; гепарин; барвники (азур, еозин та азотнокисле срібло).

### **Порядок виконання роботи**

#### **I. Культивування лімфоцитів периферійної крові людини**

Шкіру пальця продезинфікувати, знежирити і підсушити. Для цього її слід протерти стерильною ватою, змоченою сумішшю спирту з ефіром. Здавити м'якіть фаланги з боків і швидким рухом скарифікатора проколоти шкіру на глибину всього леза, щоб кров виступала без надавлювання. Коли з'явиться краплина крові, під її основу підвести кінець стерильного капіляра, тримаючи його горизонтально і трохи (щоб не закрити отвір) притискаючи до шкіри. Кров заповнює капіляр (за законом капілярності). Швидко набрати кров до мітки (0,5 мл). Після взяття крові до місця проколу прикласти

ватний тампон, змочений 5 %-им спиртовим розчином йоду та притиснути його великим пальцем тієї ж руки.

Кров ввести в стерильний пеніциліновий флакон, який містить 0,1 мл розбавленого в 20 разів гепарину, і закрити стерильним гумовим корком, в який додатково введена голка для проходження повітря. Приготована таким чином кров може зберігатися в холодильнику до трьох днів.

У флакон з фітогемаглютиніном (ФГА – очищений міоген, виділений з бобів) ввести 5 мл стерильної бідистильованої води або 0,9 %-го розчину NaCl. Стерильною мікропіпеткою відібрати 0,015 мл ФГА та ввести у флакон з кров'ю. Далі стерильною піпеткою (на 2 мл) ввести 1–2 мл середовища Хенкса (або середовища № 199) та 0,5 мл інактивованої сироватки ВРХ. Флакон герметично закрити стерильним корком, обережно струсити і поставити в термостат за температури 37 °С на 72 год. Флакони необхідно щодоби струшувати в один і той самий час.

## **II. Приготування метафазних пластинок**

У культурі клітин з ФГА лімфоцити вступають в мітотичний цикл щодоби, через 54–72 год. досягаючи максимальної кількості числа мітозів. У нестерильних умовах у флакон з культурою ввести 0,1 мл розчину колхіцину (1 мг на 100 мл 0,9 %-го розчину NaCl). Доданий в культуру колхіцин зупиняє мітоз на стадії метафази.

Через 2 год вміст флакону перенести в центрифужні пробірки, виконати оброблення клітин гіпотонічним розчином (додати 5 мл нагрітого до 37 °С 0,55 %-го розчину хлориду калію на 5–8 хв). Провести центрифугування протягом 8 хв за 1000 об/хв. Піпеткою видалити надосадову рідину, а на осад повільно нашарувати 3–4 мл суміші спирту й оцтової кислоти (3:1). Через 30 хв вміст пробірки ретельно перемішати та відцентрифугувати протягом 8 хв при 1000 об/хв та видалити частину надосадової рідини. Якщо супернатант бурий, фіксування повторити два–три рази. На знежирені предметні скельця, промиті в хромовій суміші, які зберігаються в холодильнику в 10 %-му водному розчині етилового спирту, нанести суспензію клітин методом розбитої краплі з висоти 30 см. На одне скло нанести 3–4 краплі. Предметні скельця необхідно підсушити в термостаті за температури 37 °С.



### III. Фарбування хромосомних препаратів

Для отримання класичного каріотипу використовують різні методи забарвлення хромосом барвниками або їх сумішами. Залежно від зв'язування барвника з різними ділянками хромосом фарбування відбувається нерівномірно і утворюється характерна смугаста структура (комплекс поперечних міток, англ. *Banding*), що відображає лінійну неоднорідність хромосоми, специфічну для гомологічних пар хромосом. Використовуються різні комплекси барвників. Такі методики отримали загальну назву диференційованого фарбування хромосом:

- **G-фарбування** – модифіковане фарбування за Романовським-Гімзою, використовують як стандартний метод цитогенетичного аналізу. Його застосовують у разі виявлення незначних аберацій і маркерних хромосом;

- **C- фарбування** – застосовують для аналізу центромерних ділянок хромосом, що містять конститутивний гетерохроматин і варіативні ділянки Y-хромосоми;

- **T-фарбування** - застосовують для аналізу теломерних ділянок хромосом;

- **Q-фарбування** – фарбування за Касперсоном акрихін-іпритом з подальшим дослідженням під флуоресцентним мікроскопом. Найчастіше застосовують для дослідження Y-хромосом (швидке визначення генетичної статі, виявлення транслокацій між X- та Y-хромосомами або між Y-хромосомою і аутосомами);

- **R-фарбування** – використовують акридиновий-оранжевий і подібні барвники, при цьому забарвлюють ділянки хромосом, нечутливі до G-фарбування.

Мікродозатором нанести на препарати метафазних хромосом по 50 мкл бідистильованої води, 150 мкл 50 %-го розчину нітрату срібла ( $\text{AgNO}_3$ ) і 100 мкл 2 %-го розчину желатину. Ретельно перемішати, накрити покривним скельцем та поставити в термостат на 8–10 хв за температури 56 °С. Через 10 хв змити барвник, зневоднити препарати 70 %-им етиловим спиртом та дати мазку підсохнути в термостаті 10 хв. Дофарбувати мазки барвником Гімза-Романовського (занурити скельця в склянку з розчином барвника на 15–20 хв). Промити мазки під струменем проточної води, висушити на повітрі. Пофарбовані препарати мікроскопіюють з імерсійною олією за збільшення 10×100.

## Оброблення експериментальних даних

Для одержання об'єктивних результатів необхідно проаналізувати не менш 20-ти метафазних пластинок, кращі сфотографувати. З зразків роздрукованих фото метафазних пластинок вирізати хромосоми та скласти каріограми.

### Аналіз одержаних результатів

На основі одержаних результатів зробити висновки про стан каріотипу та рівень хромосомних аберацій.

### Запитання для самоперевірки

1. Що таке каріотип?
2. Як записують каріотип людини відповідно до міжнародної номенклатури?
3. Які хромосомні аберації та геномні мутації можуть виникати та як їх класифікують?
4. Який механізм виникнення Робертсонівських транслокацій?
5. З якою метою визначають порушення каріотипу?

Джерела: [1].

## Лабораторна робота 2

**Молекулярно-цитогенетичний метод флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH) у діагностуванні складних форм хромосомних порушень**

**Мета роботи** – провести флуоресцентну *in situ* гібридизацію (FISH) для діагностування складних форм хромосомних аберацій у людини.

### Завдання роботи

1. Отримати навички приготування цитогенетичних препаратів.
2. Опанувати методику приготування флуоресцентних ДНК-

проб.

3. Отримати навички роботи з флуоресцентним мікроскопом.
4. Виконати оцінку якості цитогенетичних препаратів.

### Теоретичні відомості

У випадках складних хромосомних перебудов, прихованих делецій за клінічної картини певного синдрому, пов'язаного з мікроструктурними аномаліями хромосом, необхідно додатково проводити аналіз каріотипу із залученням молекулярно-цитогенетичних методів флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH). FISH-діагностика полягає у фарбуванні хромосом набором флуоресцентних барвників, які зв'язуються зі специфічними ділянками хромосом (рис. 2).

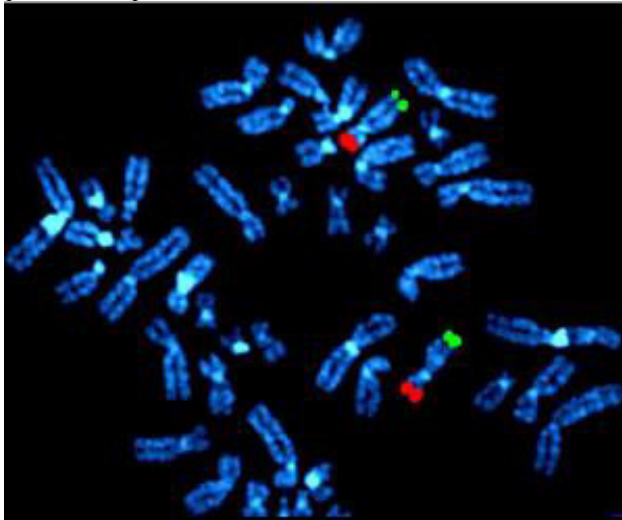


Рис. 2. Метафазна пластинка людини пофарбована флуоресцентними барвниками

У результаті такого фарбування гомологічні пари хромосом набувають ідентичних спектральних характеристик, що не тільки істотно полегшує виявлення таких пар, а й полегшує виявлення міжхромосомних транслокацій, тобто обмін негомологічними ділянками між негомологічними хромосомами, оскільки транслоковані ділянки мають спектр, що відрізняється від спектру решти хромосом.

Молекулярно-цитогенетичне діагностування (пре- та постнатальне) хромосомних порушень методом FISH проводиться пробандам з множинними вродженими порушеннями розвитку, які зумовлені певними хромосомними абераціями, проте не виявлені або не уточнені за використання стандартних методів фарбування хромосом. Наприклад, в родинях з порушеннями репродуктивної функції, пацієнтам з клінічно вираженими синдромами мікрodelецій (синдром Ангельмана, Вільямса, Вольфа-Хиршхорна, Ди Джорджи/del22q11.2, Міллера-Дикера, Прадера-Виллі, Сміта-Мадженіса та ін.), а також з аномаліями хромосом не уточненої природи. Для виконання FISH на цитологічному препараті необхідно експериментальним шляхом денатурувати ДНК, потім на цей препарат нанести фрагмент міченої ДНК і виконати ренатурування. Мічена ДНК замінить нативний ланцюг в тому місці хромосоми, де знаходиться гомологічний фрагмент ДНК. Використовуючи методику, досить легко встановити локалізацію гена або фрагмента ДНК у хромосомі. Для цього необхідно мати мічені фрагменти ДНК-зонди.

## **Обладнання, прилади та матеріали**

Бокс з бактерицидною лампою; холодильник; термостат на 37 °С; центрифуга на 3 000 об/хв з функцією «вортекс»; гібридизаційна камера (герметично закрита ємність об'ємом не більш як 0,5 дм<sup>3</sup>, здатна зберігати задану температуру та високу вологість протягом 1 доби), сушожарова шафа, світловий мікроскоп з флуоресцентним модулем.

## **Порядок виконання роботи**

### **I. Приготування цитогенетичних препаратів для FISH**

Для FISH використовують цитогенетичні препарати лімфоцитів периферійної крові, фібробластів, клітин букального епітелію, ворсин хоріона або плаценти. Відбір зразків біологічного матеріалу і культивування клітин виконують за стандартними методиками. Гібридизацію *in situ* молекулярної ДНК-проби на хромосому-мішень проводять на певній обмеженій ділянці предметного скельця. Ділянка цитогенетичного препарату повинна містити достатню кількість

клітинного матеріалу і достатню кількість метафазних пластинок. Суспензія клітин для нанесення на предметні скельця повинна мати більшу концентрацію клітинного матеріалу порівняно з концентрацією, яку використовують для приготування препаратів для фарбування GTG-методом. Оптимальне розбавлення суспензії досягається емпіричним шляхом. Препарати для FISH готують за 3 доби до виконання гібридизації і зберігають за кімнатної температури.

Для отримання якісних препаратів необхідно попереднє виконати ферментативну оброблення препаратів:

1. Нагріти 100 мл розчину 10 мМ HCl до 37 °С і додати 0,5 мл робочого розчину пепсину.

2. Інкубувати препарат у робочому розчині пепсину за температури 37 °С 5 хв, а далі відмивати в буфері PBS №1 за кімнатної температури протягом 5 хв.

3. Інкубувати препарат у розчині формальдегіду за кімнатної t° С 10 хв (100 мкл розчину нанести на зону гібридизації і покрити покривним скельцем). Відмивати препарат у буфері PBS №2 за кімнатної протягом 5 хв та фіксувати у спиртах різної концентрації (70, 85 і 96 %-й) протягом 3 хв в кожному.

## **II. Приготування флуоресцентних ДНК-проб та проведення FISH**

Працюючи з флуоресцентними компонентами реактивів, необхідно уникати потрапляння на них прямого світла. Для діагностування використовують: LSI – локус-специфічні молекулярні ДНК-проби, WCP – цільнохромосомні ДНК-проби та інші види олігонуклеотидів.

1. Розморозити за кімнатної температури та ретельно ресуспендувати компоненти гібридизаційної суміші (проба і гібридизаційний буфер): центрифугувати у мікроцентрифузі протягом 1–3 с, ретельно перемішати на вортексі. Крок повторити двічі.

2. Змішати в мікропробірці типу еппендорф компоненти гібридизаційної суміші (гібридизаційний буфер, ДНК-пробу, дистильовану воду) у співвідношеннях відповідно до рекомендацій фірми виробника. Розмір зони гібридизації на цитогенетичному препараті має чітку залежність від об'єму гібридизаційної суміші (24×50 мм<sup>2</sup> – 10 мкл, 18×18мм<sup>2</sup> – 5 мкл). Отриману гібридизаційну

суміш ретельно перемішати на вортексі та центрифугувати в мікроцентрифузі протягом 1–3 с.

3. Для проведення коденатурації та гібридизації необхідно попередньо підготувати та поставити в термостат гібридизаційну камеру. Неприпустиме пересихання камери протягом гібридування. Стінки камери викласти шаром фільтрувального паперу та щедро зволожити дистильованою водою, дно заповнити дистильованою водою шаром 0,5 см, умістити штатив для утримування препарату на скельці в горизонтальному положенні.

4. Нагріти електроплитку до необхідної температури, вказаної у табл. 1., нанести необхідний об'єм проби на зону гібридування препарату та негайно накрити покривним скельцем (не припустиме утворення повітряних пухирців).

5. Заклеїти краї покривного скельця резиновим клеєм, не залишаючи проміжків. Помістити препарат у термостат і виконати коденатурацію за умов, вказаних в табл. 1. Далі покласти препарат горизонтально в підготовану гібридизаційну камеру і помістити в термостат на час гібридування (табл. 1).

Таблиця 1

Умови проведення FISH для основних видів ДНК-проб

Проба	Температура денатурування, °С	Час денатурування, хв	Температура гібридування, °С	Час гібридування, год
WCP	68–75	5	37	18
LSI	73–75	3–5	37	18

6. Після гібридування виконати відмивання препаратів. Для отримання чітких якісних флуоресцентних сигналів на ДНК-мішені необхідно уникати потрапляння прямого світла на препарат; контролювати температуру та об'єм розчину для відмивки. У три хімічних відмивних склянки окремо налити розчини для промивання: №1– 70 мл 0,4×SSC/0,3%NP-40; №2– 2×SSC/0,1%NP-40; №3 – H<sub>2</sub>O<sub>дист.</sub>

**а) 0,4×SSC/0,3% NP-40** pH 7,0–7,5 (довести pH 1M NaOH): 20 мл 20×SSC; 950 мл H<sub>2</sub>O; 3 мл NP-40. Перемішати і довести об'єм H<sub>2</sub>O до 1000 мл.

**б) 2×SSC/0,1%NP-40** pH 7,0±0,2 (довести pH 1M NaOH): 950 мл 2×SSC; 1 мл NP-40. Перемішати і довести об'єм H<sub>2</sub>O до 1000 мл.

с) 2×SSC pH 7,0±0,2 (довести pH, 1M NaOH): 100 мл 20×SSC; 850 мл H<sub>2</sub>O. Розчинити і довести об'єм H<sub>2</sub>O до 1000 мл.

д) 20×SSC pH 5,3 (довести pH, використовуючи 1M HCl): 175,3 г NaCl; 88,2 г Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> × 2H<sub>2</sub>O; 800 мл H<sub>2</sub>O.

Солі розчинити і довести об'єм H<sub>2</sub>O до 1000 мл.) На водяній бані довести температуру першого розчину до 73±1 °С, інші повинні бути кімнатної температури (промивний розчин використати протягом дня).

7. Відділити накривне скельце від препарату та негайно перенести препарат у склянку з розчином №1, відмивати препарат протягом 2 хв, струшуючи кожні 3 с. Перенести препарат у склянку з розчином №2 та промивати протягом 1 хв. Далі промивати в дистильованій воді протягом 5 с.

8. Промити препарат у спирті різної концентрації - у послідовності 70, 85 та 96 %-й по 1 хв в кожному. Висушити препарати на повітрі до повного випаровування спирту.

9. Нанести 10 мкл розчину основного барвника на ділянку гібридизації та накрити накривним скельцем. Для флуорохромів *green* або *aqua* використовують світлофільтри PI або DAPI, для *orange* – тільки DAPI. Препарати зберігати в темряві за температури – 20 °С.

### Оброблення експериментальних даних

Якість цитогенетичних препаратів необхідно оцінювати з використанням флуоресцентного мікроскопа з набором відповідних фільтрів та кратністю збільшення ×200 (рис. 3).

Вимоги до препарату – висока густина матеріалу на склі, відокремленість та цілісність метафазних пластин. Аналіз сигналів на метафазах хромосом включає перегляд не менш, як 20–25 метафаз при відсутності мозаїцизму. Для уточнення мозаїчного статусу каріотипу переглядають 100 метафаз. У досліді враховуються метафази, у яких на обох аналізованих гомологічних хромосомах ідентифікують контрольні флуоресцентні сигнали, що входять до складу ДНК-проби. Аналіз сигналів на інтерфазних хромосомах включає перегляд не менш, ніж 50 інтерфазних клітин.



Рис. 3. Світловий мікроскоп Primo Star з флуоресцентним модулем iLED.

### **Аналіз одержаних результатів**

Цитогенетичний аналіз завершується протоколюванням результатів та внесенням фотографій у комп'ютерну базу даних. Каріотип пацієнта, вивчений з допомогою молекулярно-цитогенетичного методу FISH, записують відповідно до правил Міжнародної системи номенклатури хромосом людини (ISCN), вказуючи вид використаної ДНК-проби.

Наприклад, 47,XY,+mar.ish dup(18)(p10)(wcp18+). Запис означає, що, в результаті стандартного цитогенетичного аналізу у чоловічому каріотипі виявлено 47 хромосом, зокрема виявлена додаткова маркерна хромосома. Запис даної інформації обмежений крапкою. Далі без інтервалу пишуть абрєвіатуру fish, що означає «in situ hybridization», і після пробілу – результати молекулярно-цитогенетичних досліджень: Маркерною є хромосома, утворена шляхом інвертованої дуплікації короткого плеча хромосоми 18 навколо точки центромери 18p10. Після завершення аналізу оформлюють висновок про результати молекулярно-цитогенетичного діагностування (Додаток 1).



## Запитання для самоперевірки

1. Поясніть, коли використовують молекулярно-цитогенетичного діагностування хромосомних порушень?
2. Як записується каріотип людини відповідно до міжнародної номенклатури?
3. Які ДНК-проби можуть бути використані у FISH?
4. Який принцип приготування флуоресцентних ДНК-проб та проведення FISH?

**Джерела:** [2; 3].

Лабораторна робота 3

### Виділення геномної ДНК з рослинного матеріалу

**Мета роботи** – опанувати сучасні способи виділення якісної геномної ДНК рослин.

### Завдання роботи

1. Приготувати гомогенати рослинного матеріалу.
2. Отримати навички виділення геномної ДНК рослин.

### Теоретичні відомості

У процесі трансформування рослин відбувається передавання та інтегрування чужорідних генів до рослинних клітин. Для ідентифікування успішного трансформування проводять молекулярно-генетичні дослідження рослин регенерантів та їх потомства. Трансгенні організми можуть бути швидко виявлені шляхом використання незначної кількості ДНК на основі ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції), але успішний скринінг великої кількості ампліфікованих фрагментів під час ПЛР вимагає використання відповідних методів ізоляції ДНК.

Методи виділення високоякісної ДНК для ПЛР вимагають невеликої кількості рослинного матеріалу, але високого рівня очищення геномної ДНК. Геномну ДНК отримують з хроматину

хромосом (рис. 4), який своєю чергою представляє комплекс ДНК, РНК та гістонових і негістонових білків.

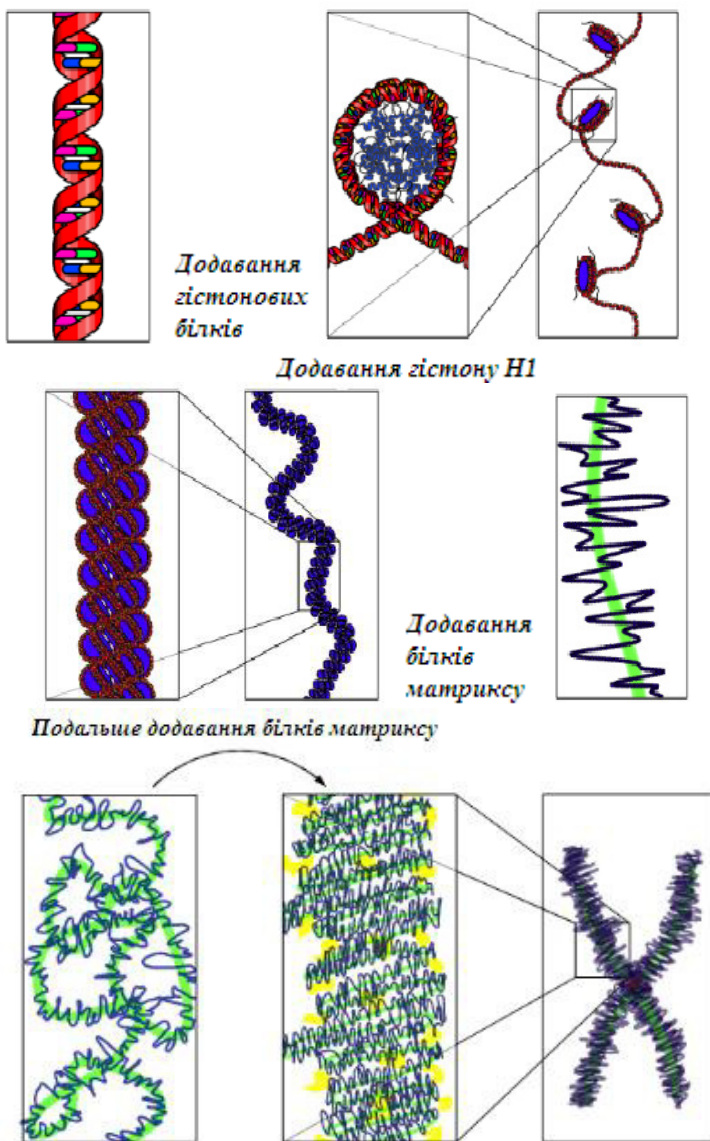


Рис. 4. Будова хромосоми

## Обладнання, прилади та матеріали

Термостат, ультрацентрифуга, центрифуга з вортексом, мікродозатори, мікропробірки типу епендорф, порцелянова ступка з товкачиком, стерильний кварцовий пісок, скляні палички. Перелік реактивів, необхідний для виконання роботи, наведений у табл. 1.

Таблиця 1

### Буфери та розчини для виділення ДНК

<b>Буфер для екстракції А (ЕБА):</b>	<b>на 100 мл</b>
2 %-й гексадецилтриметиламонію бромід (СТАВ);	2,0г
100 мМ ТРИС (рН 8.0);	10мл
20 мМ ЕДТА (використовуйте 0,5М маточний розчин);	1мл
1,4 М NaCl;	8,2 г
0,1%-ва аскорбінова кислота;	0,1 г
10 мМ $\beta$ -меркаптоетанол (ВМЕ) (використовуйте 14,3 М маточний розчин)	70 мкМ
<b>Буфер для екстракції Б (ЕББ):</b>	<b>на 100мл</b>
100 мМ ТРИС-НСl (рН 8.0) (використовуйте 1М маточний розчин);	10 мл
50 мМ ЕДТА (використовуйте 0,5 М маточний розчин);	2,5мл
100 мМ NaCl;	0,6 г
10 мМ $\beta$ -меркаптоетанол (ВМЕ) (використовуйте 14,3 М маточний розчин)	70 мкМ
<b>ТЕ буфер:</b>	<b>на 100мл</b>
10мМ ТРИС (рН 8.0) (використовуйте 1М маточний розчин) ;	1,0 мл
1мМ ЕДТА (0,5 М концентруючий розчин)	50 мкМ
<b>Інші необхідні реагенти:</b>	
20 %-й додецил сульфат натрію (sodium dodecyl sulphate (SDS));	
5 М ацетат калію або 5 М хлорид натрію (зберігати за $t - 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ );	
3 М ацетат натрію (рН 5,2);	
70 %-й $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (зберігати за $t - 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ );	
Абсолютний ізопропанол (зберігати за $t - 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ );	
Хлороформ	

### Порядок виконання роботи

1. Приготувати наважку (3 г) рослинного матеріалу (свіжі або заморожені фрукти), перенести тканину в чисту порцелянову ступку з товкачиком, додати стерильний пісок та розтерти рослинний матеріал до однорідної маси (приготувати гомогенати).

2. Швидко перенести тканину в мікроцентрифужні пробірки типу епандорф на 1,5 мл.

3. До кожної проби необхідно додати 300 мкл буферу для екстракції А (ЕБА), 400 мкл буферу для екстракції Б (ЕББ) та 200 мкл 20 %-го додецилсульфату натрію (SDS). Далі струшувати пробірки на центрифuzі (вортекс) протягом 10 хв

4. Перенести пробірки з досліджуваним матеріалом у штатив та поставити в термостат на 10 хв на інкубування за температури 65 °С. Далі необхідно перенести пробірки на лід і додати 410 мкл холодного ацетату калію для осадження білків, після чого перемішати суспензію, перевертаючи епандорфи кілька разів та розмістити мікропробірки на льоду на 5 хв.

5. Для осадження білків виконують центрифугування за 13 000 об/хв протягом 15 хв. (Якщо можливо, даний крок виконують за температури 4 °С). Далі в кожну пробірку необхідно додати 410 мкл хлороформу та центрифугувати протягом 10 хвилин за 3 000 об/хв.

6. Якщо дослідник виконав усі умови, то в супернатанті повинна міститися ДНК. Мікродозатором необхідно перенести 1 мл супернатанту до нової мікроцентрифужної пробірки на 1,5 мл додати 540 мкл крижаного холодного абсолютного ізопропанолу та поставити у лід на 20 хв. Для осадження молекул ДНК необхідно виконати центрифугування за 10 000 об/хв протягом 10 хв. Після чого обережно злити супернатант, відмити осад у 200 мкл 70%-му етиловому спирті та дати йому сохнути протягом 10 хв, перевернувши пробірку на фільтрувальний папір. Осаджену ДНК необхідно розчинити в 20 мкл ТЕ буферу та зберігати в морозильнику для проведення подальших досліджень.

### **Оброблення експериментальних даних**

Якість виділення рослинної ДНК оцінюють шляхом виконання електрофоретичного розділення фрагментів ДНК з бромистим етидієм в агарозному гелі та візуалізації результатів на транслюмінаторі.

### **Аналіз одержаних результатів**

Залежно від інтенсивності люмінесценції зробити висновок про якість виділення геномної рослинної ДНК.

## Запитання для самоперевірки

1. Поясніть, як використовують ДНК рослин у молекулярній біотехнології?
2. Який рослинний матеріал і чому може бути використаний для виділення ДНК?
3. Перелічіть основні критерії оцінки якості отриманої ДНК?

Джерела: [4].

## Лабораторна робота 4

### Виділення геномної ДНК з лімфоцитів периферійної крові ссавців

**Мета роботи** – опанувати сучасні способи виділення якісної геномної ДНК ссавців.

### Завдання роботи

1. Ознайомитися з основними методами виділення геномної ДНК ссавців.
2. Отримати навички виділення геномної ДНК ссавців.

### Теоретичні відомості

Процедура виділення ДНК має певні особливості, на які необхідно звернути увагу при виконанні роботи. Так, після етапу руйнування клітинної мембрани та лізису клітинний гомогенат має просвітлішати і стати в'язким. Чим більшою є в'язкість розчину, тим вищою є вірогідність отримання високополімерних фрагментів клітинної ДНК. Депротейнізування препарату органічними агентами не повинна значною мірою впливати на в'язкість суміші, яка містить достатню концентрації молекули ДНК з великою молекулярною масою. Якщо після очищення зразка органічними агентами спостерігається раптове зниження або повна відсутність в'язкості, то причиною є значне фрагментування макромолекул ДНК.

## Обладнання, прилади та матеріали

Термостат, ультрацентрифуга, мікродозатори, мікропробірки типу епендорф, фарфорова ступка з товкачиком, стерильний кварцовий пісок, скляні палички, гепаринізована кров тварин, літичний буфер № 1 (75 мМ NaCl; 25 мМ EDTA) та буфер № 2 (10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 10 мМ EDTA), 20 %-й розчин саркозилу натрію, 7,5 М розчин ацетату амонію, 6 М розчин гуанідингідрохлориду, 10 мг/мл розчин протеїнази К, холодний (-20 °С) 96 та 70 %-й етанол, ТЕ-буфер, парафінову стрічку (Parafilm® M), конічні колби на 100 мл, центрифуга з охолодженням та центрифужні пробірки об'єм, 30 мл, крижана баня, термостат або водяна баня (температура 50–60 °С), холодильник, самплер та наконечники для нього, епендорфи, маркер, скляні палички.

## Порядок виконання роботи

### I. Відмивання та концентрування лімфоцитів

1. Гепаринізовану кров (1 мл) ретельно змішати з 20 мл буфера № 1. Інкубувати на льоду протягом 15 хв.
2. Осадити лейкоцити центрифугуванням за 6 тис. об./хв за температури 4 °С протягом 10 хв.
3. Злити супернатант, що містить лізовані еритроцити.
4. Осад ресуспендувати невеликою кількістю буфера № 2.
5. Зрівноважити дослідний зразок аналогічною пробіркою з водою.
6. Центрифугувати за 6 тис. об./хв за температури 4 °С протягом 10 хв.
7. Злити супернатант. Якщо осад забарвлений, повторити відмивання буфером № 2 (п. 4), доки не зникне забарвлення.

### II. Лізис лімфоцитів

1. Додати 350 мкл 20 %-го розчину саркозилу натрію.
2. Додати 250 мкл 7,5 М розчину ацетату амонію.
3. Додати 3,5 мл 6 М розчину гуанідингідрохлориду.
4. Додати 125 мкл 10 мг/мл розчину протеїнази К (до кінцевої концентрації 300 мкг/мл).
5. Інкубувати зразок за температури 50–60 °С протягом 2 год.
6. Перенести пробу на лід та охолодити до температури 0 °С.

### **III. Осадження ДНК етанолом**

1. Осадити ДНК додаванням 10 мл холодного 96 %-го етанолу.
2. Промити отриману «медузу» порцією 70 %-го етанолу.
3. Центрифугувати ДНК протягом 5 хв за температури  $-4^{\circ}\text{C}$ , за 4 – 10 тис. об./хв або намотати її на скляну паличку.
4. Перенести паличку з ДНК в епендорф із 70 %-им етанолом та загерметизувати його парафіновою стрічкою. Зберігати отриманий препарат за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ .
5. Злити спирт з препарату ДНК. Підсушити осад ДНК та розчинити його в ТЕ-буфері. Зберігати за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Оброблення експериментальних даних**

Зазвичай під час осадження спиртом такі молекули ДНК формують осад, який не може намотуватися на скляну паличку. Фрагменти ДНК, які міцно тримаються на скляній паличці, мають довжину приблизно 20 тис. пар нуклеотидів і більше. Зазвичай вихід ДНК з лейкоцитів становить 30–60 мкг/мл крові.

### **Аналіз одержаних результатів**

На підставі власних спостережень та отриманих результатів зробіть висновки щодо особливостей процесу виділення препаратів хромосомної ДНК з лімфоцитів.

### **Запитання для самоперевірки**

1. Поясніть, головні методичні відмінності виділення рослинної ДНК та ДНК ссавців?
2. Який біологічний матеріал може бути використаний для виділення якісної ДНК ссавців?
3. Перелічіть основні критерії оцінювання якості отриманої ДНК?

**Джерела: [5].**

## Лабораторна робота 5

### Отримання сумарної РНК еукаріотів

**Мета роботи** – опанувати методики виділення препаратів сумарної РНК еукаріотів.

#### Завдання роботи

1. Ознайомитися з основними методами виділення РНК.
2. Виділити РНК з рослинного матеріалу.

#### Теоретичні відомості

Для отримання штамів генно-інженерного походження потрібно клонувати цільовий ген. Альтернативою «вирізання» гена за допомогою рестриктаз з нативної геномної ДНК є його ферментативний синтез на основі матрицевої РНК (мРНК). Це стало можливим лише після того, як у 1972 р. Г. Темін і Д. Балтимор (США), вивчаючи ретровіруси, відкрили зворотну транскриптазу, або, ревертазу – фермент, що здійснює синтез ДНК з матриці РНК. Ревертаза знайшла широке застосування у молекулярному клонуванні.

Загальний план дій, з отримання цільових генів за цим методом полягає у тому що, з клітин еукаріотів спочатку одержують сумарний препарат РНК, з якого виділяють індивідуальну мРНК, яка відповідає певному білку. Зворотна транскриптаза каталізує синтез першого ланцюга ДНК, комплементарного мРНК. Утворюється РНК-ДНК-гібрид. Потім РНК-матрицю видаляють методом лужного гідролізу або за допомогою ферменту РНКази. Отриману одноланцюгову ДНК називають комплементарною ДНК, або кДНК, і використовують як матрицю для синтезу другого ланцюга ДНК, який добудовують за допомогою або ДНК-полімерази I (працює тільки на матриці ДНК), або ревертази. В останньому випадку петлю, що зв'язує перший і другий ланцюги кДНК, розщеплюють нуклеазою (фермент, що специфічно руйнує одноланцюгові ділянки ДНК). Повна ДНК-копія з мРНК містить усю інформацію для синтезу білка, тобто відповідає структурній частині певного гена без інтронів та інших



нетранскрибованих послідовностей, характерних для більшості генів еукаріотів. Отриманий ген включають до складу вектора, з допомогою якого потрібну генетичну інформацію переносять у клітину-продуцент, де і відбувається синтез.

Вміст РНК у типовій клітині ссавців становить приблизно  $10^5$  мкг. РНК – це нуклеїнова кислота, яка відрізняється від ДНК за функціями, хімічним складом та вторинною структурою. Залежно від функцій розрізняють три основні класи РНК:

1. Рибосомні РНК (рРНК), що входять до складу рибосом (переважно 28S, 18S і 5S). У загальному пулі клітинної РНК їхня частка становить 80–85 %.

2. Транспортні РНК (тРНК) переносять амінокислоти до місця синтезу білка. Низькомолекулярні РНК (ядерні, тРНК тощо) становлять 10-15 % загальної кількості РНК.

3. Матрична РНК (мРНК) – це молекули, що утворюються у процесі транскрипції, тобто «зчитування» інформації з конкретних генів, і є матрицею для синтезу білка. Вміст цього типу РНК становить 1–5 % загальної кількості РНК у клітині.

### **Обладнання, прилади та матеріали**

Проростки пшениці (кукурудзи, гороху тощо) або листя верхніх ярусів рослин, рідкий азот, буфер STTEN (6 %-ва сахароза, 40 мМ трис-НСІ з рН 8, 4 %-й тритон Х-100, 25 мМ ЕДТА, 1 М NaCl), діетиловий ефір, суміш хлороформу з ізоаміловим спиртом (24:1), 6 М HCl, TE-буфер, холодний (-20 °C), 70 %-й етанол, гумові рукавички, ступка для розтирання тканини, ножиці для подрібнення рослинного матеріалу, пінцет, фільтрувальний папір, чашка Петрі, скальпель, скляні палички, склянка для промивання зразка, терези, епендорфи, маркер, конічна колба на 100 мл, центрифуга на 8 – 10 тис. об./хв, центрифужні пробірки об'ємом 20–30 мл, крижана баня.

## Порядок виконання роботи

### I. Руйнація клітинної стінки

1. Зважити 0,5–1 г листя. Промити дистильованою водою у склянці за температури 2 °С. Всі наступні дії слід виконувати в умовах крижаної бані.

2. Подрібнити листя з допомогою ножиць або бритви. Це зручно робити у чашці Петрі. Перенести шматочки рослинної тканини в охолоджену ступку.

3. Додати невелику кількість рідкого азоту і швидко заморозити зразок.

4. Старанно розтерти заморожену тканину до тонко–дисперсного стану, не допускаючи її розморожування. Для цього періодично невеликими порціями підливайте у ступку рідкий азот. За відсутності рідкого азоту рекомендують спочатку кусочки тканини залити диетиловим ефіром і витримати 2 хв, постійно помішуючи. Потім видалити ефір, промити зразок холодною дистильованою водою і гомогенізувати в охолодженому до 0–4 °С відповідному буфері.

### II. Екстрагування та депротейнізування НК

1. Скальпелем швидко перенести отриманий порошок у заздалегідь підготовану колбочку, яка містить 5 мл STTEN-буферу і 5 мл хлороформу. Ретельно суспендувати суміш, не допускаючи розшарування водної та органічної фаз, протягом 15 хв.

2. Перенести суспензію у центрифужні пробірки та зрівноважити їх. Центрифугувати за 8–10 тис. об./хв протягом 20 хв за температури 4 °С.

3. Обережно перенести водну (верхню) фазу в чисті колбочки (або пробірки) так, щоб не забруднити їх білковим осадом в інтерфазі, оцінити об'єм відібраної фази. Органічну фазу разом з денатурованим білком та клітинним дебрисом злити в спеціальний посуд для відпрацьованих органічних реагентів.

4. Додати до відібраної водної фази такий самий об'єм хлороформу та повторити екстрагування цим органічним агентом, відповідно до пунктів 2–3 до повного зникнення білкової інтерфази.

### **III. Відокремлення РНК від молекул ДНК**

1. Виміряти об'єм отриманої водної фази та додати 6М HCl у кількості 1/2 цього об'єму до кінцевої концентрації 3 М.

2. Інкубувати на льоду не менше 1 год. На цьому етапі пробу витримують за зазначених умов протягом ночі для повнішого розділення РНК та ДНК молекул. При цьому ДНК лишається у розчині, а РНК осаджується.

3. Центрифугувати пробу при 8–10 тис. об./хв. протягом 20 хв. за температури 4 °С.

### **IV. Осадження РНК спиртом**

1. Отриманий осад РНК висушити на повітрі та розчинити в ТЕ-буфері або у воді.

2. Додати 2 об'єми холодного етанолу (-20 °С) або 0,7 об'єму ізопропанолу. Оптимальний час, необхідний для осадження, залежить від кількості РНК і становить від 2 до 12–16 год. за температури -20 °С. Якщо у спирті за осадження НК випадає в осад сіль, а розчин мутнішає, додають 70%-ий етанол або 50%-ий ізопропанол у дистильованій воді доти, доки розчин стане прозорим.

3. Запобігти випадінню солі у спирті можна, знизивши її концентрацію у пробі. З цією метою концентрований препарат НК розводять у 2–3 рази водою і лише після цього додають відповідний об'єм етанолу або ізопропанолу.

4. Препарат РНК зі спиртової суміші осаджують центрифугуванням за 8–10 тис. об./хв протягом 20–30 хв за температури -4 °С.

5. Осад РНК послідовно обробляють холодним 70 %-им етанолом, 0,1 М розчином ацетату натрію, 3 М розчином ацетату натрію з подальшим центрифугуванням при 8–10 тис. об./хв за температури 4 °С протягом 20–30 хв. Потім препарат РНК знову промивають 70%-им етанолом, обережно підсушують осад і розчиняють у стерильній воді або буфері для подальшої роботи.

### **V. Підготовка препарату РНК для використання**

1. Препарат РНК зі спиртової суміші осаджують центрифугуванням за 8–10 тис. об./хв. протягом 20–30 хв. за температури 4 °С.

2. Осад РНК послідовно обробляють холодним 70%-им етанолом, 0,1 М розчином ацетату натрію, 3 М розчином ацетату натрію з подальшим центрифугуванням за 8–10 тис. об./хв за температури 4 °С протягом 20–30 хв. Потім препарат РНК знову промивають 70 %-им етанолом, обережно підсушують осад і розчиняють у стерильній воді або буфері для подальшої роботи.

### **Оброблення експериментальних даних**

Охарактеризувати отримані сумарні препарати РНК та на підставі спостережень за процесом виділення РНК з рослинних об'єктів зробити висновки.

#### **Аналіз одержаних результатів**

Якісні сумарні препарати РНК, ізольовані з клітин еукаріотів, при осадженні спиртом утворюють тонкодисперсний осад білого кольору.

#### **Запитання для самоперевірки**

1. Поясніть, які різні класи нуклеїнових кислот існують?
2. Поясніть, яке застосування мають мРНК у молекулярній біотехнології?
3. Які ви знаєте основні методи виділення РНК?
4. Які особливості виділення сумарної РНК рослин?

**Джерела: [5, 6].**

## МОДУЛЬ II. НАНОБІОТЕХНОЛОГІЯ

### Лабораторна робота 6

#### Електрофорез білків у поліакриламідному гелі (ПААГ)

**Мета роботи** – опанувати методику електрофоретичного розділення білків плазми крові ссавців.

#### Завдання роботи

1. Ознайомитися з галузями використання результатів електрофоретичного розділення білків.
2. Виконати електрофоретичне розділення білків плазми крові ссавців.

#### Теоретичні відомості

У медицині електрофорез білків (також відомий як імуноелектрофорез) є методом аналізу суміші білків, переважно сироватки крові, з допомогою гель-електрофорезу. До того часу як почали широко використовувати електрофорезні гелі, електрофорез білків виконували на папері (іноді в поєднанні з паперовою хроматографією).

Існують два класи білків крові: альбуміни сироватки і глобуліни. Вони, як правило, пропорційно рівні за кількістю, але альбуміни мають невеликий негативний заряд, що спричиняє їх накопичення у електрофоретичному гелі. Невелика смуга перед альбуміном відповідає преальбуміну. Наявність аномальних смуг, які спостерігаються за моноклональної гамопатії невідомого походження (МКНП) та мієломах різного походження, дає підстави діагностувати ці захворювання.

Електрофорез – це розділення (проходження) заряджених частинок через розчин або гель під впливом електричного поля.

Швидкість руху частинок залежить від таких чинників:

- заряду частинок;
- прикладеного електричного поля;
- температури;
- характеру суспензійного середовища.

Гель-електрофорез – це метод, який дозволяє розділяти макромолекули – нуклеїнові кислоти або білки залежно від їх молекулярної ваги, конфігурації, електричного заряду, та інших фізичних властивостей. Гель – це колоїд твердої форми. Термін – електрофорез, описує рух заряджених частинок під дією електричного поля. Частина слова «електро» стосується електричної енергії, а «форез» походить від грецького дієслова *φορος*, що означає «переносити». Таким чином, гель-електрофорез – це техніка руху молекул через пори гелю під дією електричного струму. Активовані електроди на різних кінцях гелю створюють рушійну силу. Властивості молекул визначає електричне поле, яке спричиняє рух молекули через гелеподібне середовище.

Велика кількість біологічних молекул таких як: амінокислоти, пептиди, білки, нуклеотиди та нуклеїнові кислоти мають іонізувальні групи та за будь-якого значення рН містяться в розчині у вигляді заряджених частинок, як катіони (+), або як аніони (-). Залежно від характеру сумарного заряду (позитивний або негативний) заряджені частинки будуть рухатися або до катоду, або до аноду.

Існує два основні типи матеріалів, які використовують для приготування гелів: агароза та поліакриламід. Техніка електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) була введена С. Раймондом та Л. Вайнтраубом у 1959 р. Поліакриламід подібний до матеріалу, який використовують, для створення електродів шкіри та м'яких контактних лінз. Поліакриламідні гелі дають можливість забезпечити широкий спектр електрофоретичних умов. Розміри пор гелю можуть бути змінені для отримання різних молекулярних ефектів «сита» для розділення білків різних розмірів. Їх можна регулювати в тому чи іншому гелі. Контролюючи концентрацію поліакриламиду (від 3 % до 30 %), можна отримати точні розміри пор, як правило, від 5 до 2000 кДа (кіло Дальтон). Це ідеальний діапазон для секвенування генів, білків, поліпептидного і ферментного аналізу. Можна приготувати поліакриламідні гелі певної концентрації або з різними інградієнтами. Інградієнтний гель забезпечує безперервне зменшення розміру пор згори донизу гелю, в результаті чого утворюються специфічні смуги. Завдяки даному ефекту смуг (banding effect) на градієнтному гелі можна виконати детальний молекулярно-генетичний аналіз (рис. 5).

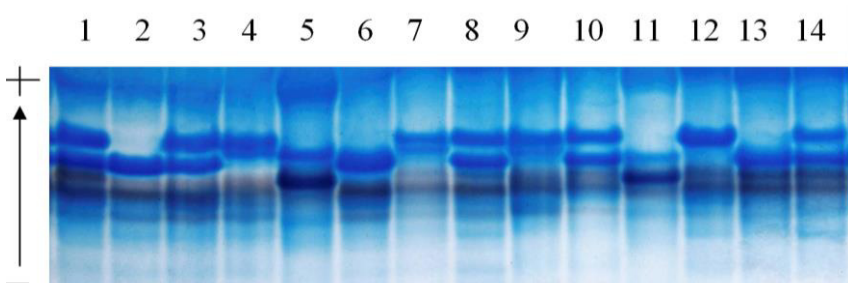


Рис. 5. Електрофорез трансферину коропа у поліакриламідному гелі: доріжки 1, 3, 8, 10, 14 генотип АС<sub>1</sub>; 4, 7 і 9 – АВ; 11 – С<sub>1</sub>Д; 12 – АА; 2 – С<sub>1</sub>С<sub>1</sub>; 6, 13– С<sub>1</sub>С<sub>2</sub>; 5 – ВД

Поліакриламідні гелі мають більшу пластичність та чіткіші виражені смуги порівняно з агарозними гелями. Оскільки, усі поліпептиди «обгорнуті» додецилсульфатом натрію (SDS) і, таким чином, сильно заряджені негативно, вони рухаються через гель залежно від їх розмірів (невеликі поліпептиди рухаються швидше, ніж великі).

Дискретний електрофорез у поліакриламідному гелі передбачає використання гелів двох типів (рис. 6):

1. Концентруючий гель (верхній);
2. Розділюючий гель (нижній).

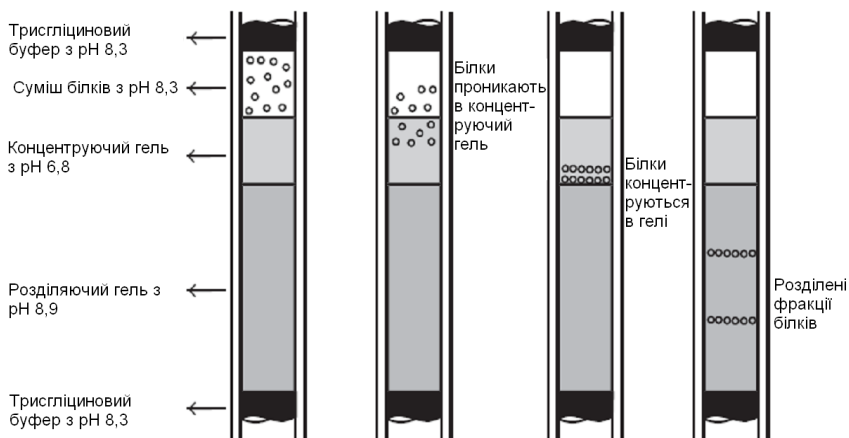


Рис. 6. Рух білків через гель-електрофоретичну систему

Концентруючий гель звичайно містить 5 % акриламід та трис-НСІ буфер з рН 6,8. Розділюючий гель має значний відсоток (звичай 10–15 %) акриламід.

Методи електрофоретичного розділення білків використовують для аналізу деяких властивостей білків, таких як ізоелектричної точки, складу білкової фракції або комплексу, чистоти білкової фракції та розміру білка і генотипування.

### **Обладнання, прилади та матеріали**

Камера для вертикального гелю електрофорезу – блок живлення, мікродозатори (самплери), наконечники на мікродозатори, мікропробірки з плазмою крові ссавців, хімічні склянки на 20 мл, 50 мл, 100 мл, скляні палички, тефлонова гребінка, скальпель, бідистильована вода.

Буфери для приготування гелів:

Нижній буфер (для розділюючого гелю) (А) (36,4 г трис; 0,4 г SDS. Довести до 100 мл  $H_2O_{\text{дист.}}$ , рН довести до 8,3 з допомогою 6 М НСІ).

Нижній буфер (для розділюючого гелю) (В) (28 г акриламід; 0,8 г біс-акриламід. Довести до 100 мл  $H_2O_{\text{дист.}}$ ). Обгорнути пляшку алюмінієвою фольгою, оскільки розчин світлочутливий.

Концентруючий (верхній) буфер (для концентруючого гелю) (Б). Розчинити 6,06 г трис; 0,4 г SDS в ~ 70 мл води, довести до рН 6,8 з допомогою 6 М НСІ, а потім довести до 100 мл  $H_2O_{\text{дист.}}$

Концентруючий (верхній) буфер (для концентруючого гелю) (Б) (10 г акриламід; 2,5 г біс-акриламід). Довести до 100 мл водою. Обгорнути пляшку алюмінієвою фольгою, оскільки розчин світлочутливий.

Електрофорезний проточний буфер рН 8,3 (для камери):

1. Трис 121,4 г;
2. Гліцин 567 г;
3. SDS 40 г;
4. Вода до 4 л.

Амідо чорний барвник для фарбування гелевої пластинки на предмет виявлення трансферину):

- Метанол 40 мл;
- 10 мл льодяної оцтової кислоти;



Amido Black 10B 0,1 г;

ПСА 10 г. Довести до 100 мл Н<sub>2</sub>О<sub>дист.</sub>

Барвник Кумасі (для фарбування гелів, які не використовуються для переміщення). Бромфеноловий синій (барвник для нанесення плазми в гель).

## Порядок виконання роботи

### **I. Відповідно пропису приготувати нижній розділюючий гель:**

1. Нижній буфер (А) 2,345 мл;
2. Нижній буфер (Б) 9,166 мл;
3. Вода 10, 211мл;
4. Персульфат амонію (ПСА) 0,275 мл (275 мкл);
5. TEMED 0,08 мл (80,0 мкл) (додавати TEMED в витяжній шафі);

**Усього 22,077 мл.**

Акриламід у неполімеризованій формі є потужним нейротоксином, тому слід надягати рукавички під час приготування гелів, камери для проточного гелю та переміщення гелю. Після додавання останнього компоненту – персульфату амонію (ПСА) – гель почне швидко полімеризуватися, тому необхідно швидко й обережно залити гель в простір між скельцями камери для електрофорезу (дочекайтесь полімеризування гелю).

### **II. Відповідно пропису приготувати верхній концентруючий гель:**

1. Концентруючий (верхній) буфер В 0,5 мл (500 мкл);
2. Концентруючий (верхній) буфера Г 2 мл (2000 мкл);
3. Вода 2,5 мл (2500 мкл);
4. Персульфат амонію 0,04мл (40мкл);
5. TEMED 0,04 мл (40 мкл) (додавати TEMED в витяжній шафі);

**Усього 5,08 мл.**

Обережно залити розчин у простір між скельцями камери, швидко до початку полімеризування вставте між скельцями тефлонову гребінку.

**III.** Після полімеризування обережно вийняти тефлонову гребінку з концентруючого гелю так, щоб утворилися лунки. Залити проточний трис-гліциновий буфер у лунки.

**IV.** Підготувати аліквоти білків. Вони мають бути кімнатної

температури. З допомогою самплеру додати 2мкл барвника – амідю чорного, в кожную лунку на плашці і додати білки (5 мкл) у кожную лунку окремиим наконечником, ретельно перемішуючи.

**У.** Набрати мікродозатором 7 мкл проби і перенести кожную пробу окремо в лунки з концентруючим гелем.

**УІ.** Налити достатню кількість буферу в обидві – нижню і верхню – частини електрофоретичної установки так, щоб у нижній і верхній частинах поліакриламідний гель був занурений в буфер. Будьте обережні, щоб не перемішались зразки в лунках під час додавання буферу у верхню частину камери.

**УІІ.** Скласти верхню частину камери для електрофорезу, підімкнути систему до відповідного джерела живлення. Увімкнути установку в мережу. Значення постійного струму, що має проходити через гель дорівнює 20 мА.

**УІІІ.** Коли барвник досягне розділюючого гелевого шару необхідно збільшити струм до 30 мА. Струм проходить доти, доки барвник не досягне нижньої частини розділюючого гелю (приблизно 4–5 годин). Далі необхідно вимкнути установку та відімкнути від джерела живлення. Розібрати камеру та зняти скельця, між якими знаходиться гель. Помістити їх на паперовий рушник, і обережно зняти затискачі.

**ІХ.** З обох сторін між скельцями обережно виийнати спейсери. Використовуючи спейсер або пластиковий клин як важіль, обережно відокремити скло так, щоб не пошкодити гель. Підняти скло з гелем і помістити гель у ємність, заповнену барвником Кумасі. Через 12 год спостерігати результати електрофоретичного розділення білків.

### **Оброблення експериментальних даних**

Пофарбований блок перенести на скло і провести типування фракцій транспортних білків (трансферинів) для кожноі особи. Записати в робочий зошит генотипи кожноі досліджуваноі особи.

### **Аналіз одержаних результатів**

На основі одержаних результатів зробити висновок про рівень гетерозиготності та поліалелізм, якщо він наявний у досліджуваних особин.

## Запитання для самоперевірки

1. Поясніть, який принцип вертикального поліакриламідного гель-електрофорезу білків?
2. Від яких чинників залежить швидкість руху білків у поліакриламідному гелі?
3. Що таке ізоелектрична точка білку?
4. З якою метою використовують поліакриламідний гель-електрофорез білків?

Джерела: [7; 8].

## Лабораторна робота 7

### Агарозний гель-електрофорез фрагментів ДНК

**Мета роботи** – освоїти методику електрофоретичного розділення фрагментів ДНК.

### Завдання роботи

1. Провести електрофоретичне розділення фрагментів ДНК рослинного та тваринного походження.
2. Виконати порівняльний аналіз швидкості міграції фрагментів ДНК рослинного та тваринного походження.

### Теоретичні відомості

Горизонтальний агарозний гель електрофорез це – методом, який використовується в молекулярній біотехнології, для розділення фрагментів ДНК та РНК різної довжини. Молекули нуклеїнових кислот розділяють застосовуючи електричне поле, в результаті чого негативно заряджені частинки рухаються в агарозному гелі. Молекули з меншої довжини переміщуються швидше та мігрують у гелі далі, порівняно з довгими фрагментами. Гель електрофорез виконується в спеціальних камерах (рис. 7) і використовується як антиконвективне середовище, тобто середовища в якому відбувається «просіювання» рух заряджених частинок під дією електричного поля.

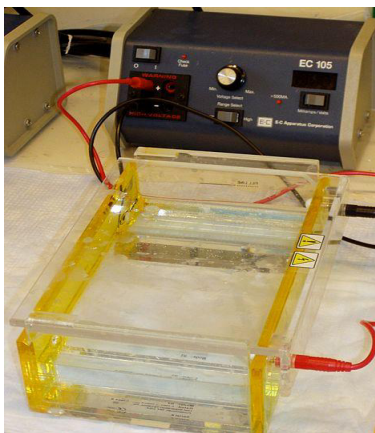


Рис. 7. Камера для горизонтального гель-електрофорезу

Гелі пригнічують теплову конвекцію, викликану електричним полем та виконують функцію середовища просіювання (сита). Гель електрофорез ДНК зазвичай виконується в аналітичних цілях, часто після збільшення кількості специфічних фрагментів ДНК за рахунок полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а також як підготовчий етап для встановлення якості виділення ДНК.

Агароза складається з довгих послідовностей лінійних полісахаридів, утворених чергуванням залишків  $\beta$ -D-галактопіранози та 3,6-ангідридо- $\alpha$ -1-галактопіранози з'єднаних 1-4 глікозидними зв'язками. Різні зразки внесені в суміжні лунки будуть рухатися паралельно, але з різною швидкістю в залежності від молекулярної ваги фрагментів ДНК. В залежності від кількості різних молекул в пробі, кожна лінія демонструватиме окремий компонент вихідної суміші. Лінії в гелі, які знаходяться на однаковій відстані від початку гелевого блоку містять молекули, які рухаються з однаковою швидкістю, що зазвичай свідчить, що вони майже однакового розміру. Для того, щоб встановити довжини фрагментів використовують маркери відомого розміру. Існує велика кількість маркерів довжини ДНК, зокрема такі як: лямбда HindIII, лямбда PstI, PhiX174. Маркери підбирають в залежності від того якої довжини фрагменти ДНК розраховують отримати. Для продуктів ПЛР невеликого розміру обирають PhiX174, а для фрагментів 6 тис. пар основ – лямбда HindIII. Зараз компанії виробники пропонують

маркери з групами «бендів» в певних інтервалах: 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5 тис. пар основ і так далі до 10 тис. пар основ. Агарозний гель електрофорез може використовуватися для розподілу фрагментів ДНК в межах від 50 пар основ до декількох мільйонів. При використанні гелів з різними концентраціями агарози можна розділити фрагменти ДНК різних довжин. Вищі концентрації агарози дають можливість провести розподіл менших фрагментів ДНК, тоді як низькі концентрації агарози дозволяють розподілити в гелі великі фрагменти ДНК. На рис. 8 показано переміщення ряду фрагментів ДНК в агарозному гелі трьох різних концентрацій, які розподілялися в одній і тій же камері, за використання однакової напруги та протягом однакового проміжку часу.

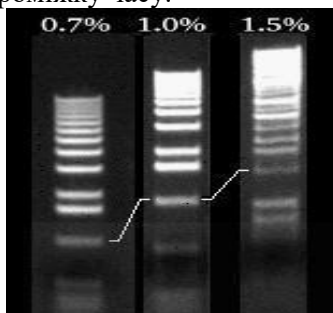


Рис. 8. Розподіл фрагментів ДНК

Зверніть увагу, як великі фрагменти набагато краще розподілені в 0,7 %-му гелі, тоді як маленькі фрагменти відокремилися краще в 1,5 %-му. На рис. 8 в кожній доріжці гелю відмічено фрагмент довжиною 1000 пар основ.

Оскільки напруга прикладена до гелю збільшується, то великі фрагменти мігрують пропорційно швидше порівняно з маленькими. Найкращий розподіл фрагментів ДНК довжиною 2 тис. пар основ досягається при застосуванні напруги не більше, ніж 5 В на см<sup>2</sup> гелю.

На сьогоднішній день рекомендовано декілька різних буферів для електрофорезу фрагментів ДНК. Зазвичай для подвійної ДНК використовують ТАЕ (трис-ацетат-ЕДТА) та ТВЕ (трис-борат-ЕДТА). Фрагменти ДНК мігрують в гелі за різних умов в цих двох буферних системах, оскільки розчини мають різну іонну силу. Буфера не лише визначають рН показник, але і забезпечують іони для підтримки електропровідності.

Під час електрофорезу проводять фарбування макромолекул, щоб зробити їх видимими. ДНК можна візуалізувати використовуючи бромистий етидій, який позначається як EtBr. Фрагменти ДНК, які рухаються через EtBr-гель накопичує даний барвник, що і дає можливість візуалізації цих молекул під ультрафіолетовим світлом. Інтенсивність флюорисценції залежить від кількості ДНК, тому для візуалізації необхідно не менше 20 нанограмів ДНК. EtBr – відомий мутаген, тому зараз при можливості використовуються менш небезпечні барвники, такі як SYBR Green I, який в 25 разів більш чутливий та безпечніший, ніж EtBr.

Застосування електрофоретичного розділення фрагментів ДНК:

- Оцінка розміру молекул ДНК після обробки ферментами - рестриктазами, наприклад, при картуванні клонованої ДНК.
- Аналіз продуктів ПЛР, наприклад, в молекулярно-генетичній діагностиці або генетичному фінгерпринтінгу.
- Розподіл фрагментів геномної ДНК для проведення *Southern* блотингу.

### **Обладнання, прилади та матеріали**

Камера для горизонтального гелю електрофорезу та блок живлення, кювета для заливки гелю, типові гребінки для створення лунок, транслюмінатор (ультрафіолетовий лайтбокс), який використовується щоб візуалізувати ДНК з етидіумом бромиду, латексні рукавички, 10 x буфер трис-борат-ЕДТА (ТБЕ) (0,9 М трис, 0,9 М борна кислота, 20 мМ ЕДТА. рН доводять до 8,1 – 8,2 сухою борною кислотою, агароза), бромистий етидій (10 мг/мл в стерильній дистильованій воді), бромфеноловий синій.

### **Порядок виконання роботи**

I. Приготувати робочий розчин буферу трис-борат-ЕДТА 10xТБЕ:

- 218 г трис;
- 110 г борної кислоти;
- 9,3 г EDTA.

Розчинити компоненти в 1,9 л дистильованої води. рН показник довести до 8,3 сухою борною кислотою або розчином NaOH. Об'єм розчину розвести до 2 л дистильованою водою. З робочого розчину приготувати 1xТБЕ в об'ємі, достатньому для заповнення камери для

електрофорезу та приготування гелю.

3. Додати до  $1 \times \text{TBE}$  агарозу в кількості, необхідній для отримання 0,45 %-го – 0,75 %-го розчину та нагріти на водяній бані до повного розчинення агарози.

4. Охолодити суміш приблизно до  $50^\circ\text{C}$ . За час охолодження заклеїти краї кювети для гелю клейкою стрічкою (рис. 9). Додати до розчину агарози бромистий етидій до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл та обережно перемішайте уникаючи виникнення в гелі пухирців повітря.

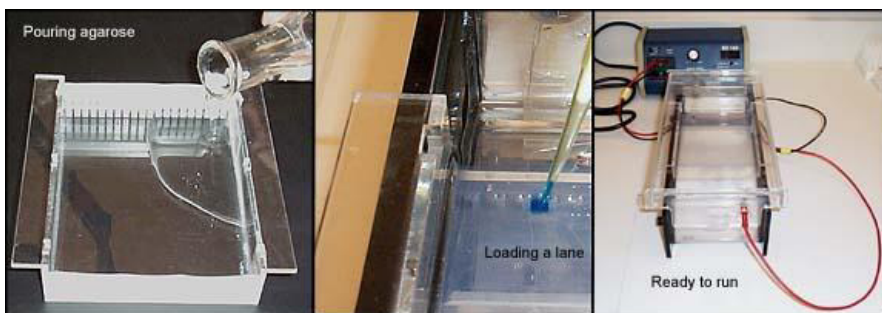


Рис. 9. Приготування гелю та внесення проб у лунки

5. Теплу агарозу влити в кювету для гелю (рис. 9) і рівномірно розподілити її в кюветі. Вертикально вставити гребінку так, щоб її зубчики не доторкалися до дна кювети приблизно на 1,5 мм.

6. Залишити кювету з агарозним гелем на 30 хв, потім обережно видалити гребінку та клейку стрічку. Кювету з гелем помістити в камеру для електрофорезу, яка містить необхідну кількість  $1 \times \text{TBE}$  з бромистим етидієм в кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл.

7. Підготувати до електрофорезу зразки досліджуваної ДНК, тобто змішати з буфером для нанесення (5:1). Щоб отримати чіткий сигнал після забарвлення бромистим етидієм, в лунку шириною 5 мм достатньо внести 200 нг маркерної ДНК. Для побудови стандартної кривої необхідно використовувати маркерні фрагменти, довжина, яких приблизно рівна довжині досліджуваної ДНК.

9. Обережно внести в лунку досліджувану та маркерну ДНК (рис. 10). Для підвищення точності визначення розміру фрагменту ДНК, маркерну ДНК вносять з обох боків від досліджуваної.

10. Підключити електроди горизонтальної камери для електрофорезу до джерела живлення та виконайте електрофоретичне розділення фрагментів ДНК при градієнті напруженості 1–3 В на 1 см гелю протягом 1–3 год.

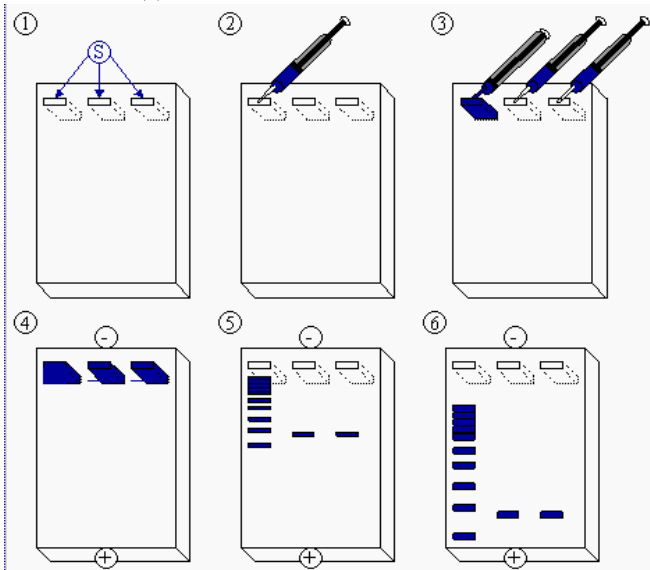


Рис. 10. Внесення проб ДНК у лунки

### Оброблення експериментальних даних

У випадку, якщо необхідно перевірити чи вдалося виділити ДНК з біологічного матеріалу, в гель з етидіумом-бромідом вносять 20 нанограмів проби ДНК. Для візуалізації продуктів полімеразно-ланцюгової реакції зазвичай використовують 10-20 мікролітрів в залежності від умов реакції.

### Аналіз одержаних результатів

Для аналізу результатів необхідно вийняти шпателем агарозний гель, перенести його на транслюмінатор та в ультрафіолетовому світлі проаналізувати результати розділення фрагментів ДНК. Зафіксуйте результати за допомогою фото-системи та вkleйте зображення в робочий зошит.

### Запитання для самоперевірки



1. Які фізико-хімічні властивості ДНК?
  2. Який фізичний принцип електрофоретичного методу дослідження біомолекул?
  3. Від яких фізико-хімічних чинників залежить ефективність електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот?
  4. Які барвники і чому використовують для візуалізування результатів електрофорезу нуклеїнових кислот?
- Джерела: [5; 9].

## Лабораторна робота 8

### Отримання та детекція наночастинок

**Мета роботи** – опанувати методику отримання люмінесцентних вуглецевих наночастинок.

#### Завдання роботи

1. Отримати наночастинок вуглецю – вуглецеві точки.
2. Детектувати наявність вуглецевих точок за їх люмінесценцією.

#### Теоретичні відомості

Наноструктури мають розміри від 1 до 100 нм ( $1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$ ), що зумовлює їхні унікальні фізичні і хімічні властивості. Нанотехнології – це сукупність наукових знань, способів і засобів спрямованого регульованого складання (синтезу) з окремих атомів та молекул різних речовин, матеріалів і виробів з лінійним розміром елементів структури до 100 нм. До нанооб'єктів відносять окремі утворення, що мають розмір 1–100 нм в одному або більше вимірах (наночастинок, нановолокна, наносфери, нанокapsули, ліпосоми, дендримери, нанотрубки, наноплівки тощо), а також нанокомпозити – матеріали, що складаються з макроскопічної полімерної матриці та диспергованих у ній нанорозмірних утворень.

Багато біологічних молекул мають нанорозміри, наприклад, лінійні розміри інсуліну становлять близько 2,2 нм, гемоглобін та фібронектін – від 4,5 до 7,0 нм, ліпопротеїнів – близько 20 нм, фібриногену – від 5 до 70 нм (рис. 11).



Рис. 11. Біологічні молекули, які мають нанорозміри: *а* – гемоглобін (68 kDa, 4,5 x 7 нм), *б* – ліпопротеїн (1300 kDa, 20 нм), *в* – фібронектин (68 kDa, 4,5 x 7 нм), *г* – бичачий фібриноген (300 kDa, 5 x 70 нм).

Квантові точки – це кристалічні кластери найчастіше напівпровідникових матеріалів, розміром 1 – 10 нм у трьох вимірах. Вуглець у деяких формах є провідником. Алмаз – алотропна форма карбону – є напівпровідником.

Квантові точки характеризують широкі спектри поглинання і вузькі симетричні спектри випромінювання, відносна фотостабільність. Їх люмінесценція триває кілька сотень наносекунд (порядку  $10^{-7}$ с). Довжина випромінюваних хвиль залежить від розміру квантової точки, може бути від 365 до 1 350 нм. Квантові точки можуть бути флуоресцентними зондами, які використовують у біотехнології для імунофлуоресцентного аналізу, візуалізування живих клітин, досліджень організмів *in vivo*.

Люмінесценція – це випромінювання фотонів з електронно-збуджених станів. За збудження речовини шляхом поглинання нею певної енергії її електрони переходять на енергетично вищі рівні. Перехід електронів з більш енергетично високих рівнів на нижчі супроводжує випромінювання. Випромінювати можуть речовини, збуджені впродовж хімічної реакції (хемілюмінесценція), біохімічної реакції (біолюмінесценція), окисно-відновної реакції на електроді (електрохемілюмінесценція).

Люмінесценцію можна поділити на флуоресценцію та фосфоресценцію залежно від характеру випромінювального переходу.

Фосфоресценція – це випромінювання, що може бути тривалим у часі (протягом  $10^{-3}$ – $10^{-2}$ с), оскільки існує спінова заборона для такого переходу зі збудженого триплетного стану  $T_1$  в основний синглетний стан  $S_0$  ( $T_1 \rightarrow S_0$ ).

Флуоресценція – це випромінювання, або дозволений за спином випромінювальний перехід, що відбувається під час повернення електрона на нижчу енергетичну орбіталь, у основний стан  $S_0$ , з

найнижчого синглетного коливального рівня  $S_1$  (перехід між синглетними станами  $S_1 \rightarrow S_0$ ). Речовина-флуорофор поглинає (абсорбує) і випромінює світло, але випромінює світло, яке має більшу довжину хвилі, тобто, меншу енергію. Зсув спектру випромінювання щодо спектру збудження називають зсувом Стокса (рис. 12).

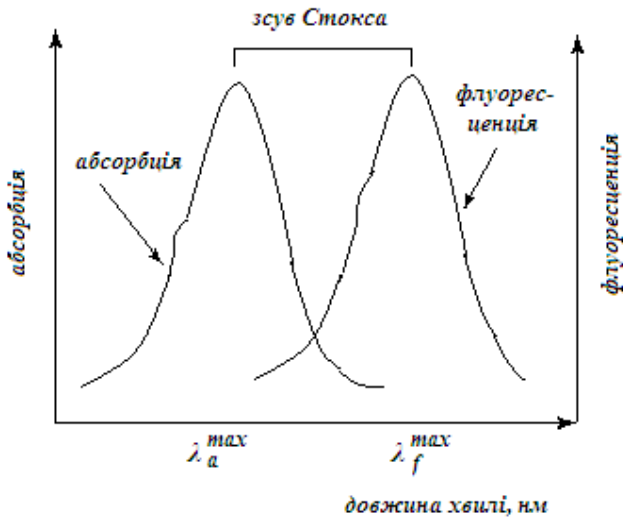


Рис. 12. Типові спектри абсорбції та флуоресценції

За високих швидкостей випромінювання загасання флуоресценції відбувається протягом незначного часу –  $10^{-11}$ – $10^{-6}$ с. Час флуоресценції – це середній проміжок часу, протягом якого флуорофор знаходиться у збудженому стані.

Схематично процеси, які відбуваються впродовж поглинання та випромінювання світла, ілюструє діаграма Яблонського (рис. 13). Переходи між станами показані вертикальними лініями.

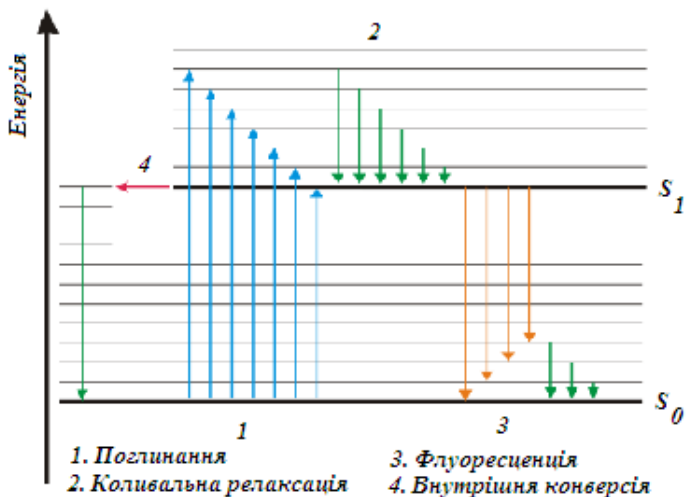


Рис 13. Діаграма Яблонського

Електрони квантових точок мають кілька стаціонарних рівнів енергії з характерними відстанями між ними. Протягом переходу між енергетичними рівнями квантові точки можуть випромінювати фотони. Змінюючи розміри квантових точок, можна змінювати частоти переходів, тобто, отримувати люмінесценцію з різною довжиною хвиль.

Флуоресцентні наночастинки вуглецю є різноманітними структурами, які включають короткі фрагменти графена, оксиду графена, нанотрубок, вуглецевих точок (рис. 14).

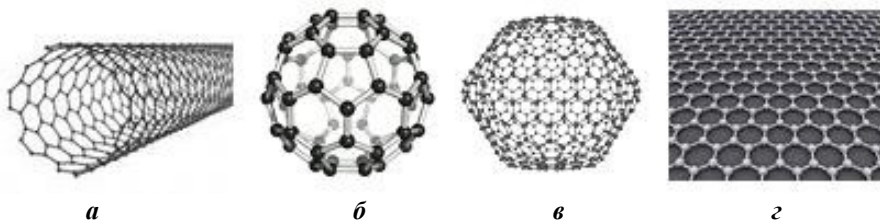


Рис. 14. Вуглецеві наноб'єкти: а – одностінна нанотрубка; б – порожнистий багатогранник правильної форми – фулерен C<sub>60</sub>; в – фулерен C<sub>540</sub>; г – алотропна модифікація вуглецю – графен

Вуглецеві точки (С-точки) різноманітні за методом творення,

складом і хімічною модифікацією їх поверхні. Вони досить дешево синтезуються, мають стабільну флуоресценцію у водному середовищі, нетоксичні. Тому вони можуть бути альтернативою до традиційних люмінофорів.

Вуглецеві точки отримують методом гідротермічного оброблення різноманітних органічних сполук, наприклад, лимонної кислоти, аланіну, гліцерину, сахарози та багатьох інших. Залежно від методики отримання, застосовуваних розчинників вуглецеві точки відрізняються між собою за своїми флуоресцентними властивостями. Так, у разі використання дистильованої води пік флуоресценції зміщується в бік ультрафіолетового діапазону спектру порівняно з розчинниками, у яких наявна значна кількість солей кальцію, калію та магнію.

Для вуглецевих точок не прослідковується залежності спектра люмінесценції від розміру наночастинок, але люмінесцентні вуглецеві наночастинки, отримані різними методами, мають різний спектр випромінювання.

### **Обладнання, прилади та матеріали**

Лимонна кислота, тіосечовина, аланін, сахароза кристалічні; вода дистильована, етанол, гліцерин, розчин Рінгера (рН 7,4), поліетиленгліколь (ПЕГ-150), скляні палички, шпатели, тигель фарфоровий об'ємом 20 мл, склянка об'ємом 100 мл, терези лабораторні, лампа чорного світла (Delux EBT-01, 26 Вт), електрична піч, мікрохвильова піч, лабораторна центрифуга, центрифужні та звичайні пробірки, темна кімната.

### **Виконання роботи**

Для отримання вуглецевих точок, що мають блакитну флуоресценцію, виконують наступні операції:

1. Наважки 0,21 г (1 ммоль) лимонної кислоти та 0,23 г (3 ммоль) тіосечовини розчиняють у 5 мл дистильованої води.
2. Прозорий розчин переносять у фарфоровий тигель та піддають нагріванню у електричній печі за температури 180°C протягом двох годин до утворення чорної речовини.
3. Отриманий продукт кількісно переносять у центрифужну

пробірку, змиваючи 10 мл етанолу.

4. Рідину центрифугують за 5 000 об./хв протягом 5 хв. Чорний осад відкидають. Супернатант переливають в іншу пробірку. У етанолі містяться наночастинки вуглецю.

5. Пробірки уміщують у сушильну шафу за температури 75 °С на кілька хвилин для випаровування спирту. На стінках пробірки осідають наночастинки вуглецю.

6. Наночастинки змивають зі стінок пробірки 3–5 мл дистильованої води, рідину кілька разів набирають у піпетку, а далі із силою випускають на стінки, таким чином ретельно перемішуючи вміст.

7. Для детекції вуглецевих точок за їх флуоресценцією вміст пробірки опромінюють лампою чорного світла (довжина хвилі  $360 \pm 15$  нм). Під час опромінення, що здійснюють у темряві, спостерігають блакитну флуоресценцію вуглецевих точок.

Для отримання «фіолетових» вуглецевих точок 0,5 г аланіну розчиняють у 2 мл дистильованої води і обробляють у мікрохвильовій печі (600 Вт) протягом 1,5 хв. Отриману речовину розбавляють дистильованою водою і потім піддають декільком центрифугуванням за 5 000 об./хв протягом 5 хв. Супернатант збирають, опромінюють у темряві лампою чорного світла, спостерігають фіолетову флуоресценцію.

Для отримання «синіх» вуглецевих точок 5 мл гліцерину змішують з 3 мл розчину Рінгера (рН 7,4) і 2 мл дистильованої води, обробляють у мікрохвильовій печі (700 Вт) протягом 6 хв. Отриманий продукт розводять дистильованою водою і потім піддають декільком центрифугуванням за 5 000 об./хв протягом 5 хв. Супернатант збирають, опромінюють у темряві лампою чорного світла, спостерігають синю флуоресценцію.

Для отримання «зелених» вуглецевих точок 4 г сахарози змішують з 0,5 г ПЕГ-150 і додають 26 мл дистильованої води. Після цього зразок збирають та обробляють у мікрохвильовій печі (600 Вт) протягом 4 хв. Далі до зразка додають ще 30 мл дистильованої води для його розчинення, центрифугують за 5 000 об./хв протягом 5 хвилин. Супернатант збирають, опромінюють у темряві лампою чорного світла, спостерігають зелену флуоресценцію.

## Оброблення експериментальних даних

Зобразіть схематично ймовірні спектри збудження та флуоресценції отриманих вуглецевих наночастинок (вуглецевих точок, С-точок).

Намалюйте схему, що показує відповідність довжини хвилі світла певному кольору. Позначте, якого саме кольору флуоресценції наночастинок Ви отримали.

### Аналіз одержаних результатів

Поясніть, від чого залежить спектр люмінесценції квантових точок. Чи залежить спектр люмінесценції вуглецевих наночастинок від їх розмірів? Як отримати вуглецеві точки, що мають блакитну, фіолетову, синю флуоресценцію?

Спектри збудження, емісії та поглинання можуть бути записані автоматично на спектрофотометрах та спектрофлуориметрах з пристроями, що будують графіки. Наприклад, з використанням спектрофотометру LambdaBio (PerkinElmer) та спектрофлуориметру QuantaMaster (PTI) були записані спектри для отриманих наночастинок вуглецю (рис. 15):

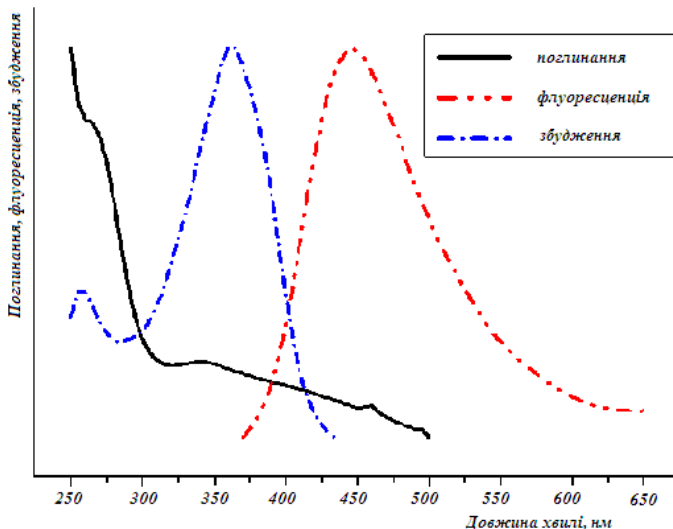


Рис. 15. Спектри збудження, емісії та поглинання вуглецевих точок  
Обґрунтуйте доцільність використання отриманих вуглецевих

точок як флуоресцентних зондів.

### **Запитання для самоперевірки**

1. Які структури відносять до наноструктур?
2. Що таке нанотехнології?
3. Які біологічні молекули мають нанорозміри?
4. Які наночастинки вуглецю Вам відомі?
5. Які наночастинки називаються квантовими точками?
6. Як отримати вуглецеві точки?
7. Що таке люмінесценція?
8. Чим відрізняються фосфоресценція та флуоресценція?
9. Що таке зсув Стокса? Який зсув Стокса характерний для флуоресцентних зондів?
10. Що показує діаграма Яблонського?
11. Як можна використовувати вуглецеві точки?

**Джерела: [10-14].**



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Цыренов В. Ж. Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных: учебно-методическое пособие / В. Ж. Цыренов. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2005. – 48 с.
2. Рубцов Н. Б. Гибридизация нуклеиновых кислот в анализе хромосомных аномалий. / Н. Б. Рубцов; под ред. М. А. Пальцева, Д. В. Залетаева. – М.: Медицина, 2011. – 380 с.
3. Политько А. Д. Молекулярно-цитогенетический метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в диагностике сложных форм хромосомной патологии. Инструкция по применению / Политько А. Д., Наумчик И. В., Хурс О. М., Исаакович Л. В. – Минск: Республиканский научно-практический центр, 2010. – 9 с.
4. Keb-Llanes. Plant DNA Extraction Prot<sup>o</sup>Col. Plant Molecular Biology / Keb-Llanes. – 2002. – 299 p.
5. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології : лабораторний практикум / за наук. ред. чл.-кор. НАН України, проф. Д. М. Говоруна. – К. : Академперіодика, 2010. – 232 с.
6. Молекулярная клиническая диагностика: Методы / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
7. Narisha S. Biotechnology Pr<sup>o</sup>Cedures and Experiments Handbook / S. Narisha. – ISBN, 2004. – 978 p.
8. Глазко В. И. Генетика изоферментов животных и растений / В. И. Глазко, И. А. Созинов. – К. : Урожай, 1993. – 528 с.
9. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л. А. Остерман. – М: Наука, 1981. – 237 с.
10. Joseph R. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition / Joseph R. Lakowicz . –Springer, 2006. – 954 p.
11. Чекман І. С. Нанофармакологія / І. С. Чекман. – К: Задруга, 2011. – 424 с.
12. Demchenko A. P. Introduction to Fluorescence Sensing / A. P. Demchenko. – Springer, 2008. –590 p.
13. Fluorescent carbon nanomaterials: “quantum dots” or nan<sup>o</sup>Clusters? Mariia O. Dekaliuk , Oleg Viagin, Yuriy V. Malyukin, Alexander P.Demchenko Phys. Chem. Chem. Phys., 2014,16, 16075-16084 DOI: 10.1039/C4CP00138
14. The Photoluminescence of Carbon Nanodots:Dipole Emission Centers and Electron-Phonon Coupling. Siddharth Ghosh, Anna M. Chizhik, Narain Karedla, Mariia O. Dekaliuk etc., Nano Lett., 2014, 14 (10), pp 5656–5661 DOI: 10.1021/nl502372x

Установа  
Юридична адреса  
Підрозділ установи де було виконано дослідження

**ВИСНОВОК МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНОЇ  
ДІАГНОСТИКИ**

ПІБ пацієнта: \_\_\_\_\_ дата народження \_\_\_\_\_

Ким направлений: \_\_\_\_\_

Клінічний діагноз \* *Синдром Прадера-Віллі* \_\_\_\_\_

Цитогенетичний діагноз \_\_\_\_\_ \* *46,XX*

Біологічний зразок: \* *лімфоцити периферійної крові* \_\_\_\_\_

Проведено дослідження молекулярно-цитогенетичним методом FISH за використання локус-специфічних ДНК-проб *LSI PWS/AS Region Probe – LSI SNRPN Spectrum Orange /CEP15 D15ZI Spectrum Green /PML Spectrum Orange (Vysis)*.

**Висновок:** \* *46,XX.ish 15q11~13 (SNRPN×2)*

**Інтерпретація результатів:** \* *відсутня делеція SNRPN*

**Рекомендовано:** \* *Молекулярна діагностика дисомії хромосоми 15.*

**Аналіз виконав:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Дата аналізу: \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

\* інформація наведена як приклад

## З М І С Т

Вступ.....	3
Заходи безпеки під час виконання лабораторних робіт.....	4
<b>МОДУЛЬ I. ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ.....</b>	<b>5</b>
<i>Лабораторна робота 1. Мікрометод культивування лімфоцитів периферійної крові для хромосомного аналізу.....</i>	<i>5</i>
<i>Лабораторна робота 2. Молекулярно-цитогенетичний метод флуоресцентної in situ гібридизації (FISH) у діагностуванні складних форм хромосомних порушень.....</i>	<i>10</i>
<i>Лабораторна робота 3. Виділення геномної ДНК з рослинного матеріалу.....</i>	<i>11</i>
<i>Лабораторна робота 4. Виділення геномної ДНК з лімфоцитів периферійної крові ссавців.....</i>	<i>20</i>
<i>Лабораторна робота 5. Отримання сумарної РНК еукаріотів.....</i>	<i>23</i>
<b>МОДУЛЬ II. НАНОБІОТЕХНОЛОГІЯ.....</b>	<b>28</b>
<i>Лабораторна робота 6. Електрофорез білків у поліакриламідному гелі (ПААГ).....</i>	<i>28</i>
<i>Лабораторна робота 7. Агарозний гель-електрофорез фрагментів ДНК.....</i>	<i>34</i>
<i>Лабораторна робота 8. Отримання та детекція наночастинок.....</i>	<i>41</i>
Список літератури.....	49
Додаток.....	50

*Навчальне видання*

## **МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ**

Лабораторний практикум  
для студентів напряму підготовки  
6.051401 «Фармацевтична біотехнологія»

Укладачі:

ТАРАСЮК Сергій Іванович  
ВАСИЛЬЧЕНКО Ольга Анатоліївна  
ГЛУШКО Юлія Миколаївна  
КУЧЕРЯВА Людмила Василівна