



# ЕЛЕКТИВНИЙ КУРС

(курс за вибором)

*“ Сучасні проблеми молекулярної  
біології ”*

Лекцію підготував – к.б.н.

доцент Павліченко

Віктор Іванович

[medbio@zsmu.zp.ua](mailto:medbio@zsmu.zp.ua)

*Запоріжжя*

*2015*

# Лекція № 6

## Сучасні генні технології

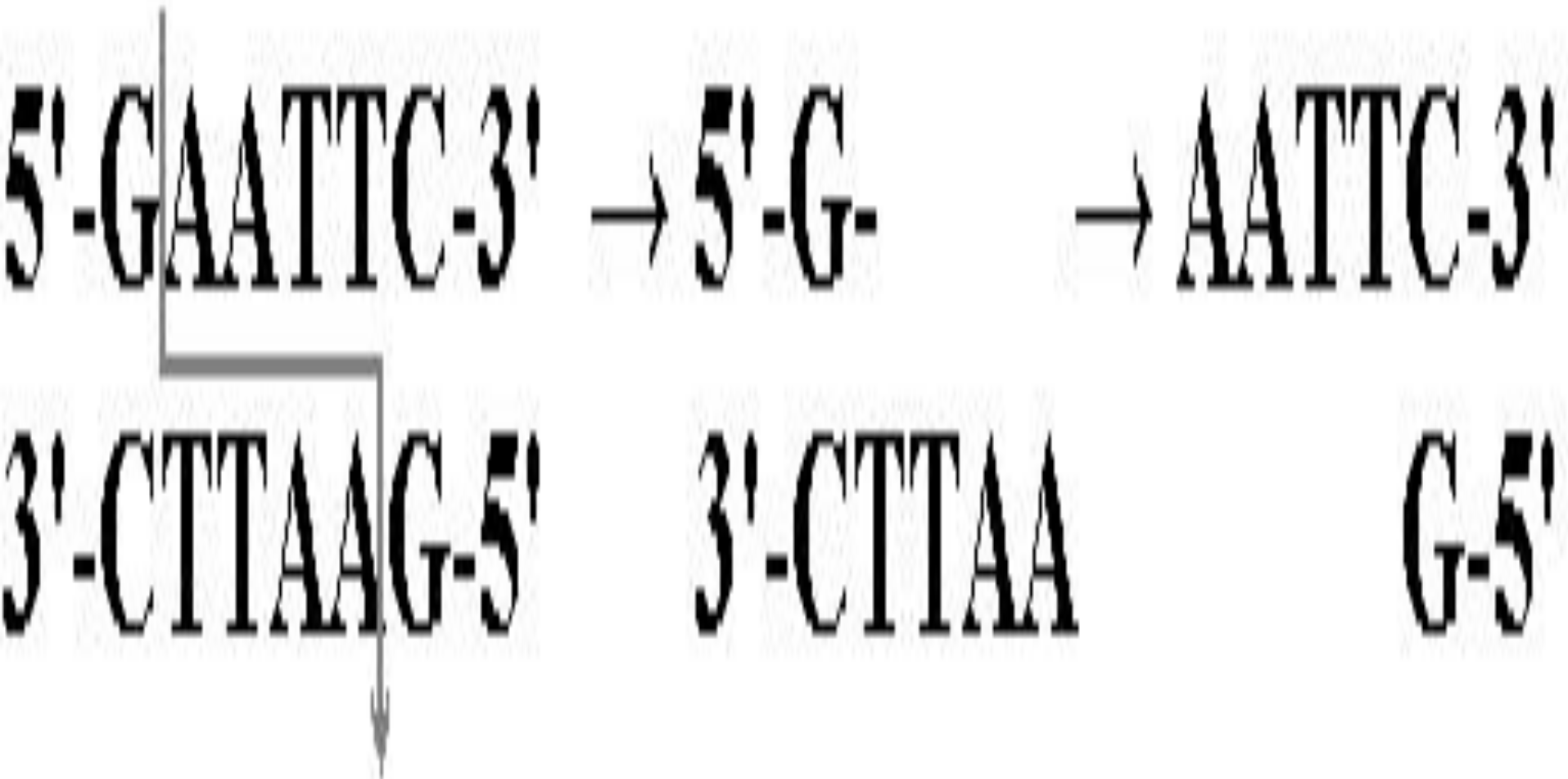
### План

1. Методи дослідження НК
2. Методи ДНК –  
діагностики (прямі та  
непрямі)

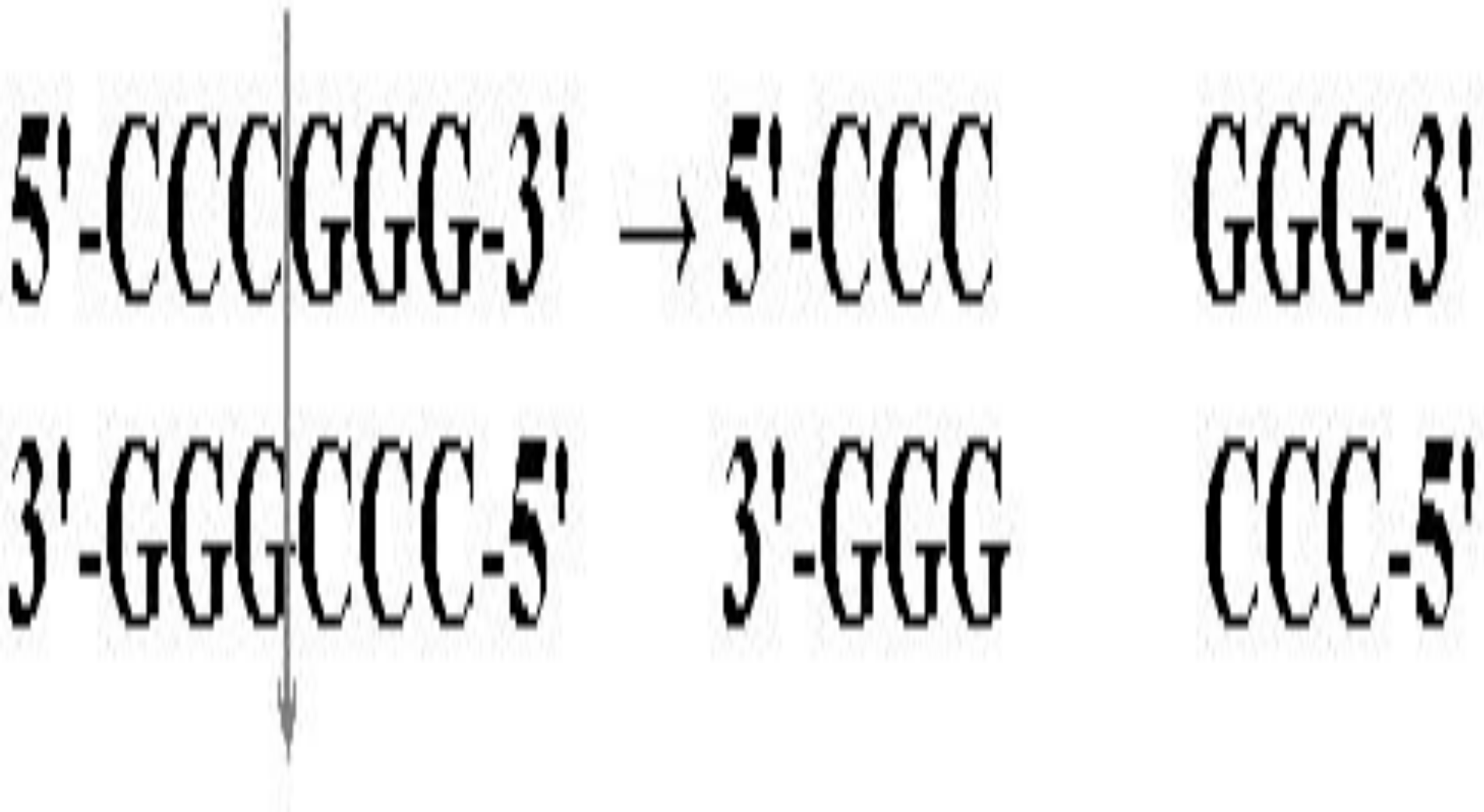
# №1 Методи дослідження НК

- Методика виділення ДНК
- Полімеразна ЛР (ПЛР)
- Секвенування ДНК
- Блоттинг ДНК
- Електрофорез
- Ідентифікація сегментів ДНК
- Зонди та гібридизація ДНК

# Утворення “липких” кінців



# Утворення “тупих” кінців



# Полімеразна ланцюгова реакція

- Принцип ПЦР сформулював Гобінд Корана в 1971
- В 1983 Кєри Мюллісу удалось провести ПЦР
- В 1993 за изобретение ПЦР Кєри Мюллісу вручена Нобелевская премия по химии



# Генодіагностика:

- інфекційних захворювань;
- онкологічних захворювань;
- лейкемій та лімфом;
- раку грудей;
- інших злоякісних захворювань;
- генетичних захворювань;
- ідентифікація особи;
- судова медицина, криміналістика;
- трансплантація органів і тканин;
- визначення батьківства;
- діагностика патогенів в їжі.



## Тест ДНК на схильність до хвороб:

аневризма, ішемічна хвороба серця,  
венозна тромбоемболія,  
базедова хвороба, туберкульоз шкіри,  
глутенова хвороба, розсіяний склероз,  
псоріаз, хвороба Альцгеймера,  
остеоартрит, ревматоїдний артрит,  
ожиріння, мігрень, цукровий діабет 1 та 2  
типу, рак (сечового міхура, грудей,  
кишківника, шлунку, легень, простати,  
шкіри) та ін.(до 25-30 хвороб).

# Дослідження геному

- ПЦР дозволяє визначати вставки, делеції або однонуклеотидні заміни в геномній ДНК
- Нині з допомогою ПЦР діагностують більше 200 спадкових захворювань, таких як:
  - Фенілкетонурія
  - Муковісцидоз
  - Міодистрофія Дюшенна/Беккера
  - Хорея Гентингтона
  - Гемофілія А, В
  - Блезнь Вільсона-Коновалова
  - і др. ...



# Устаткування для ПЛР



*Біологічний матеріал*  
*стандартного зразка для*  
*ДНК-профілю:*

кров, зразки тканин,  
волосся, сперма, нігті,  
слина, вушна сірка...

# Біологічний матеріал

## нестандартного зразка для

### ДНК-профілю:

леза бритви, муміфіковані тканини,  
згорнута кров, зразки тканин, жіночі  
гігієнічні тампони, кухонні предмети,  
склянки, зубна щітка, недопалки,  
жувальна гумка, презервативи, плями  
крові, сперма на одязі, обрізки нігтів,  
зуби, кістки....



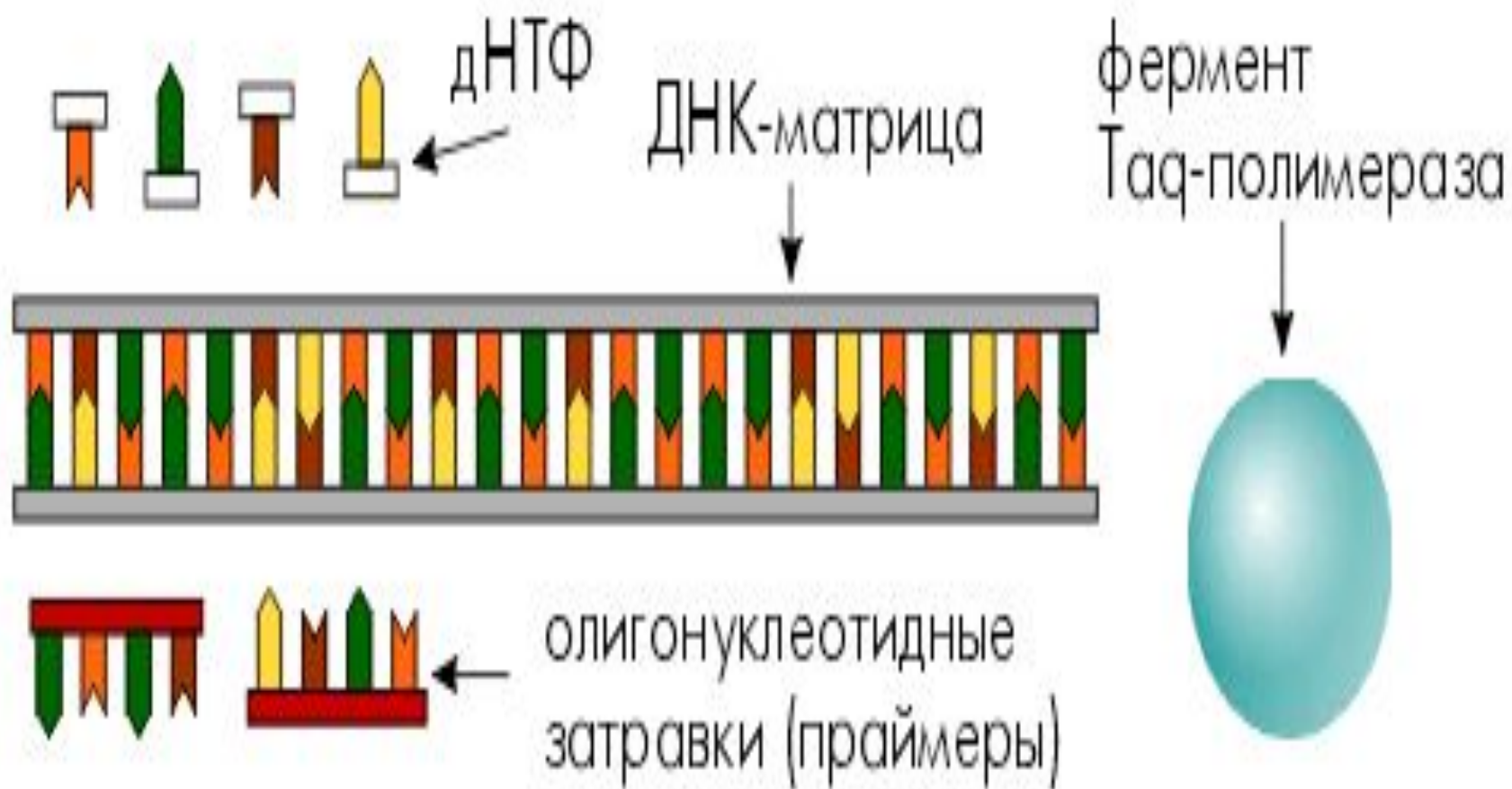
## Типова ПЛР-ампліфікація

полягає в багаторазовому повторенні трьох реакцій:

- **Денатурація** - теплова денатурація зразка ДНК при температурі 95°C впродовж 1хв. В реакційній суміші разом з ДНК містяться в надлишку два праймера, термостабільна ДНК полімераза *Taq* і 4 дезоксирибонуклеотида.
- **Ренатурація** – температуру знижують до 55 °C, відбувається гібридизації праймерів з комплементарними послідовностями ДНК,;
- **Синтез** - температуру підвищують до 75 °C, починається синтез комплементарного ланцюга ДНК, що ініціюється 3'-гідроксильною групою праймера.

## Завдання, що можна вирішувати за допомогою ПЛР

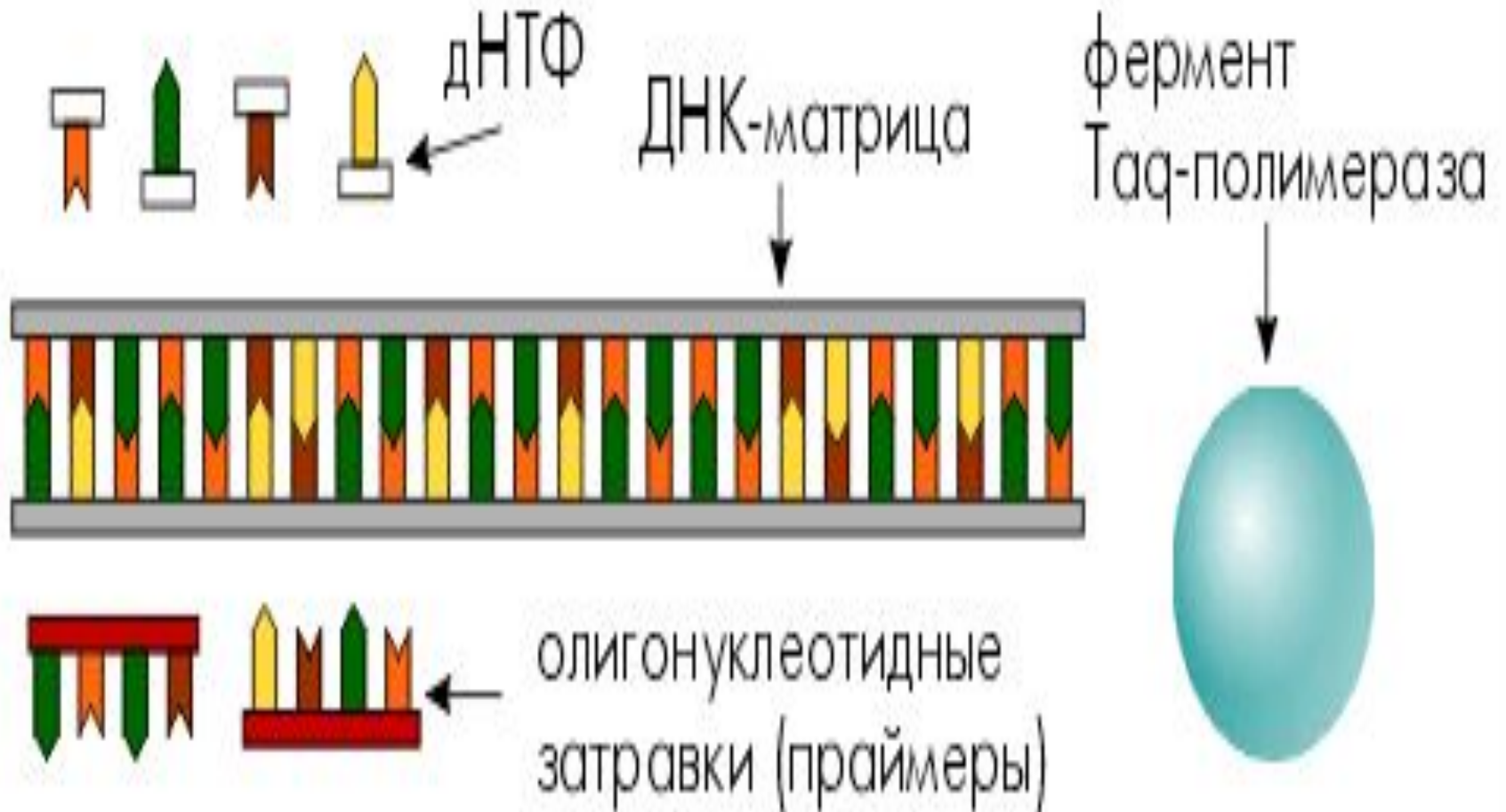
- Ампліфікувати необхідну ділянку ДНК, навіть якщо зразок містить сумарну клітинну ДНК.
- Ампліфікувати ДНК, що міститься в малих кількостях.
- Аналізувати зразки, що містять деградовану ДНК (наприклад, рослинні гербарії).



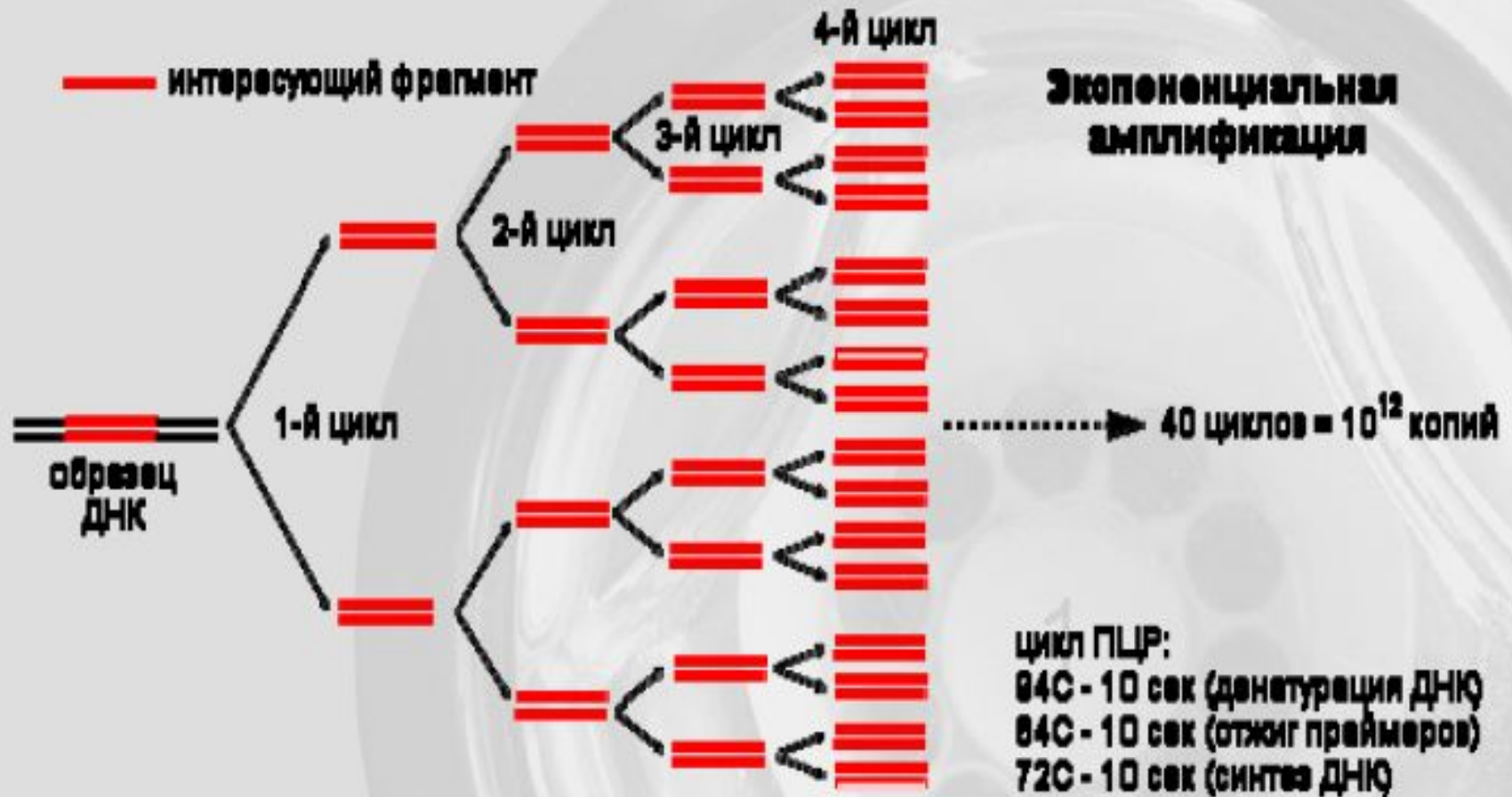
## Исходные компоненты ПЦР



# Вихідні компоненти ПЛР



# Експоненціальна ампліфікація



## № 2 Методи ДНК-діагностики

Непрямі: аналіз конформаційного поліморфізму

1 ланц. ДНК;

градієнтний гель- електрофорез;

секвенування та інші;

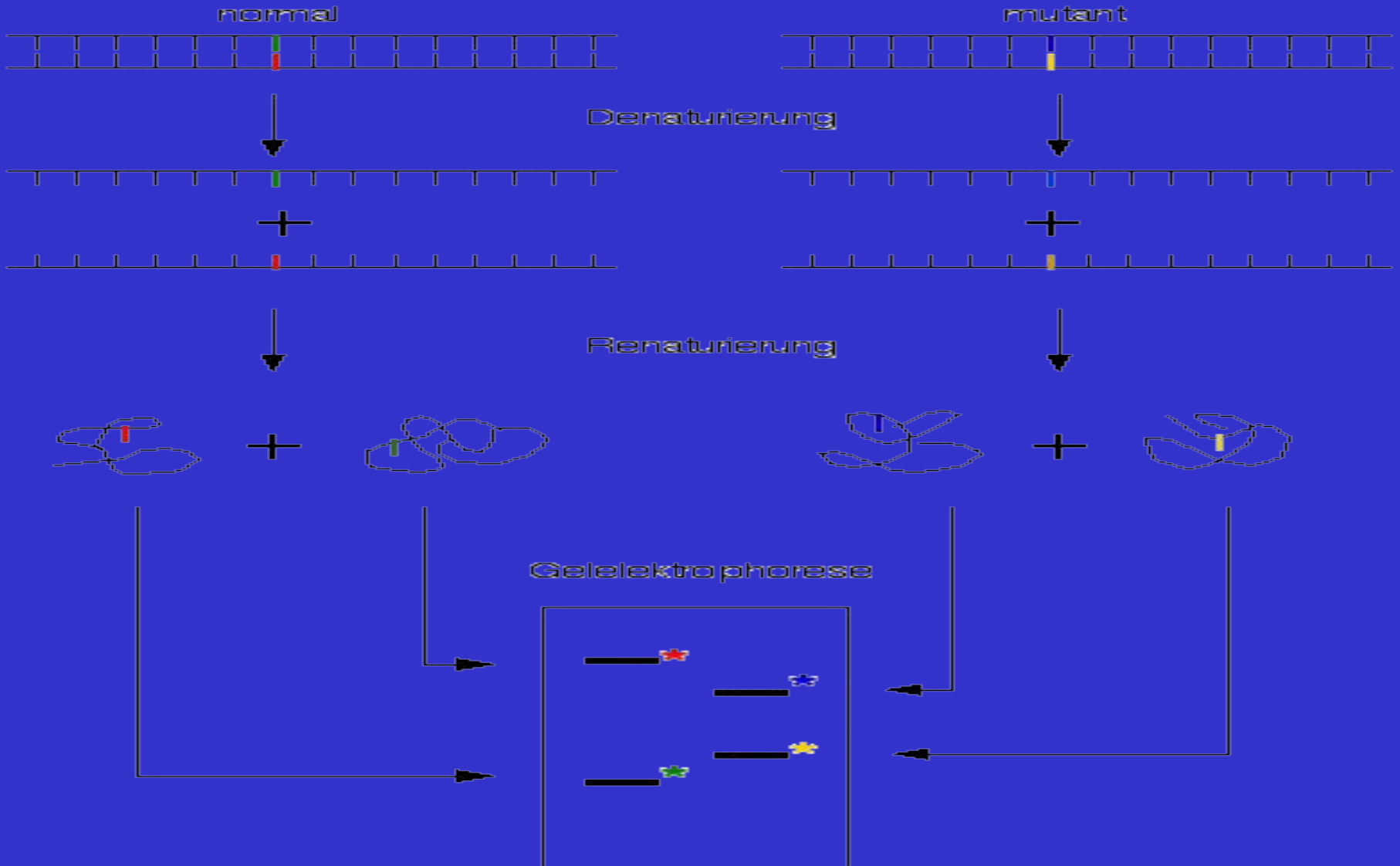
Прямі:

• ПДРФ

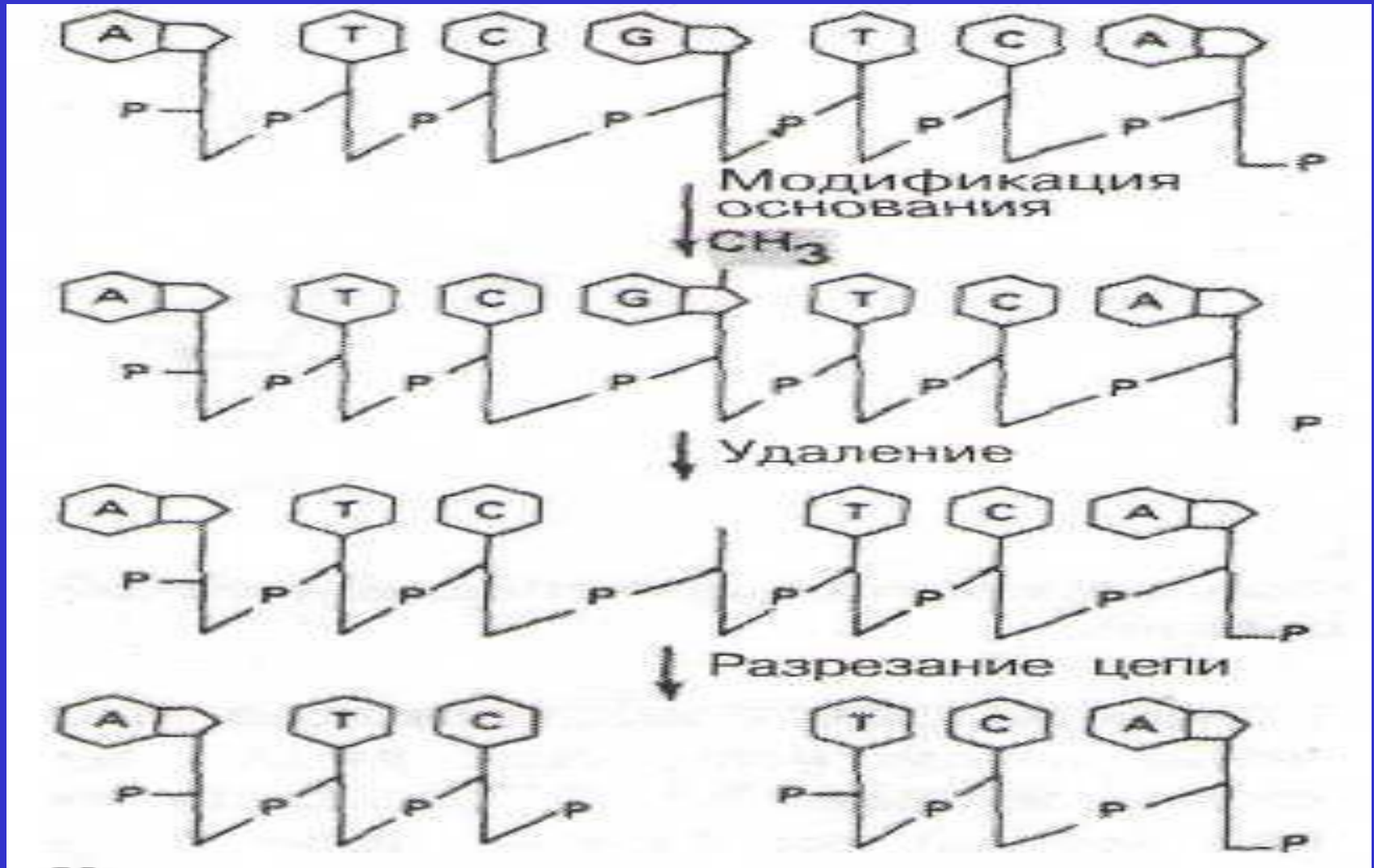
• Аналіз мікросателітів (STR)

• Аналіз мт-ДНК

# Аналіз конформаційного поліморфізму 1 ланц. ДНК



# Секвенування ДНК

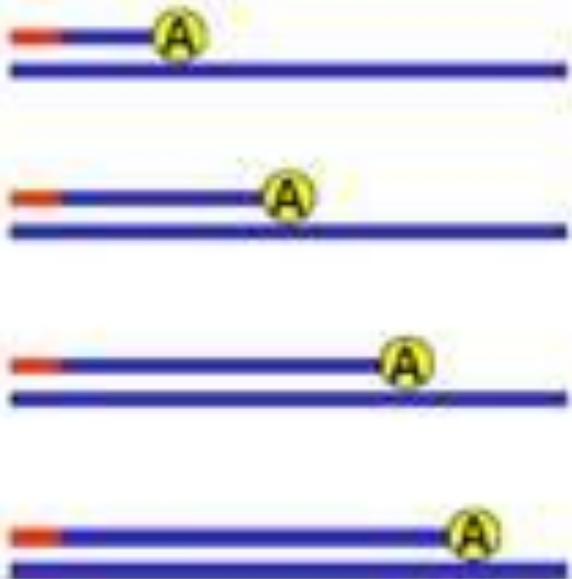


# Автоматизація секвенування

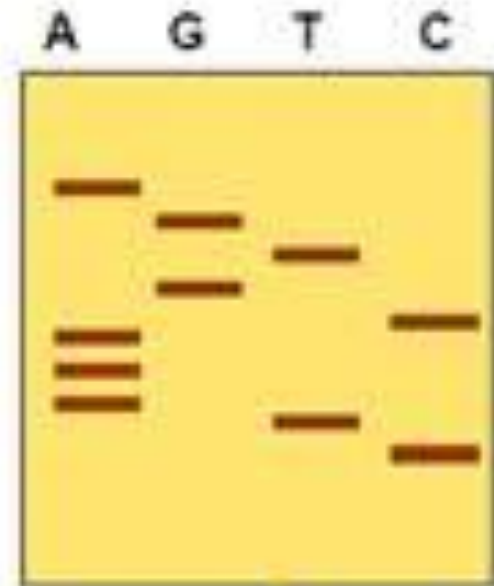
праймер

5'

ДНК-полімераза +  
dATP, dTTP, dCTP, dGTP +  
невелика кількість ddATP

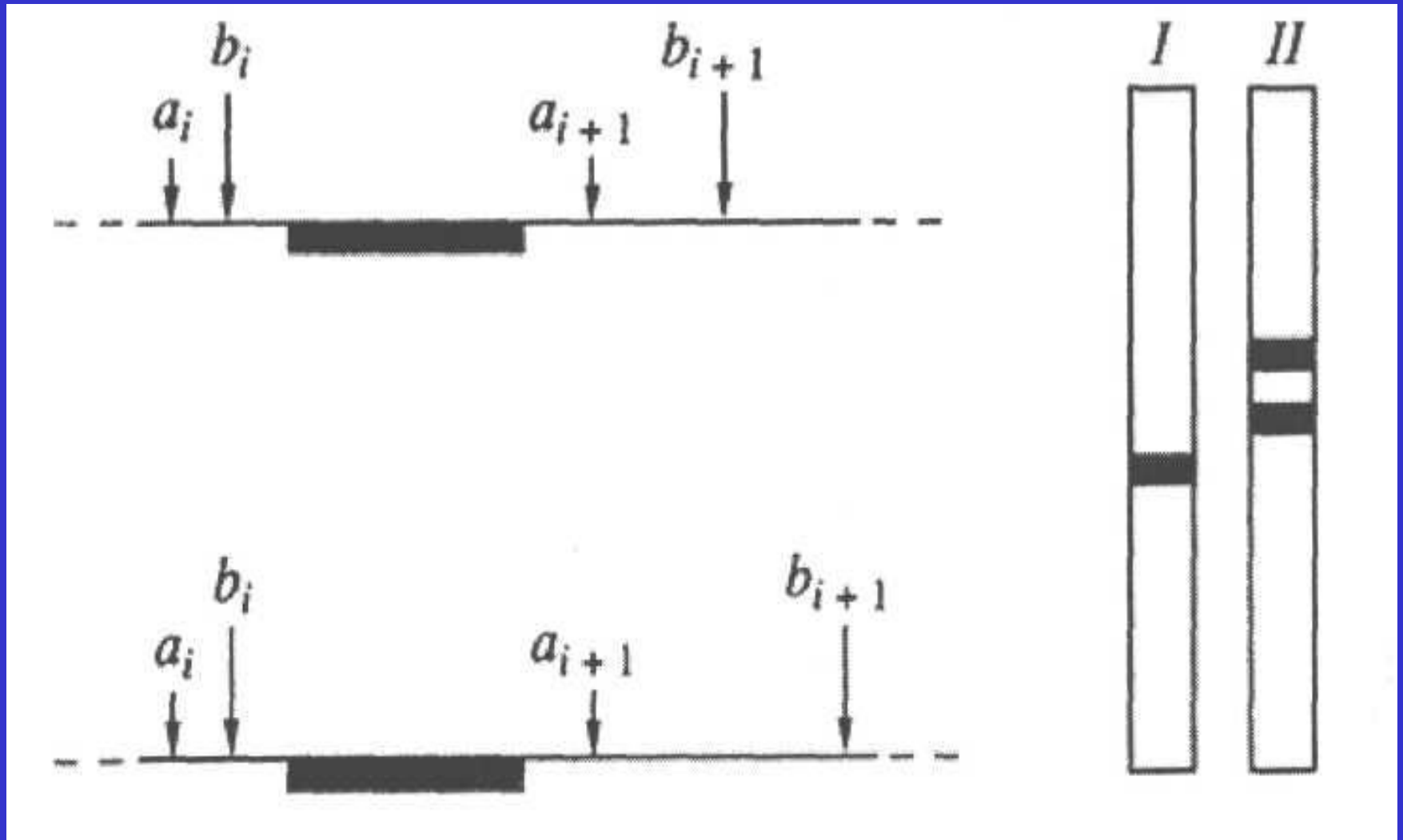


Денатурація,  
гель-електрофорез

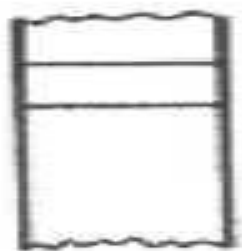
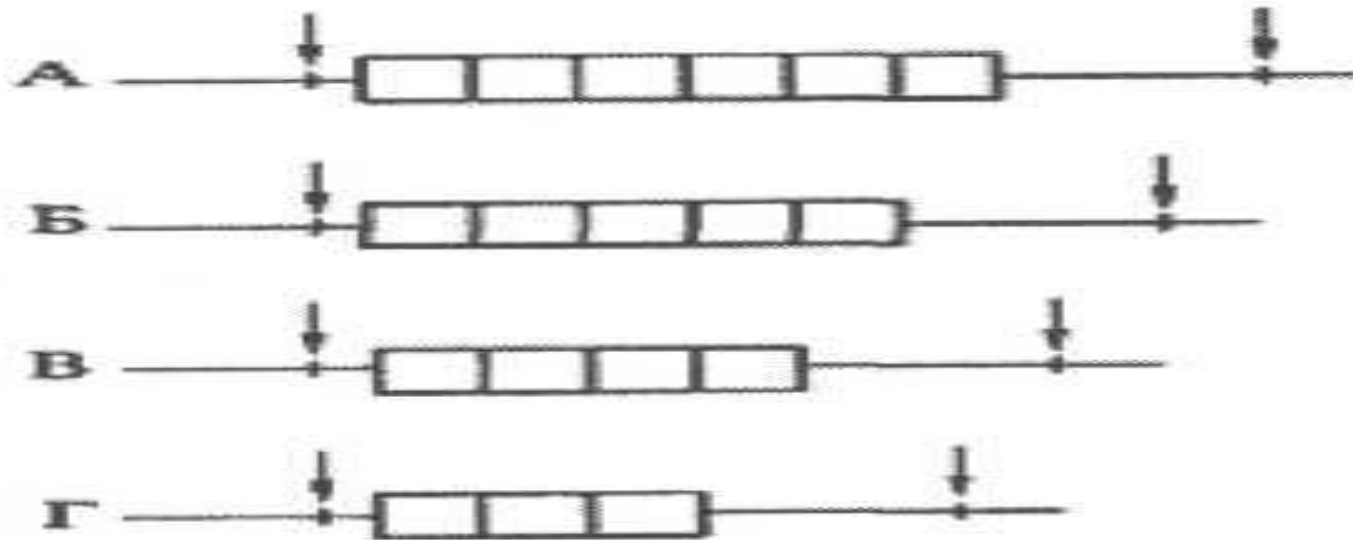


СТАААСГТГА

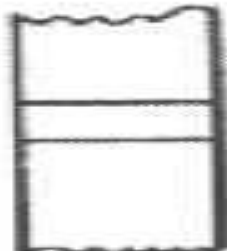
# Аналіз довжини рестриктів ДНК (ПДРФ)



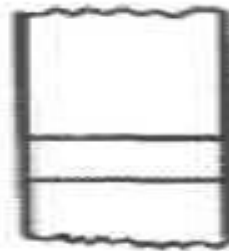
# Аналіз мікросателітів (тандемних повторів ДНК)



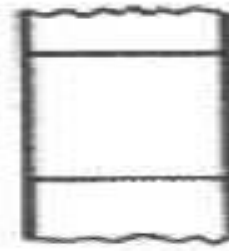
A/B



B/V



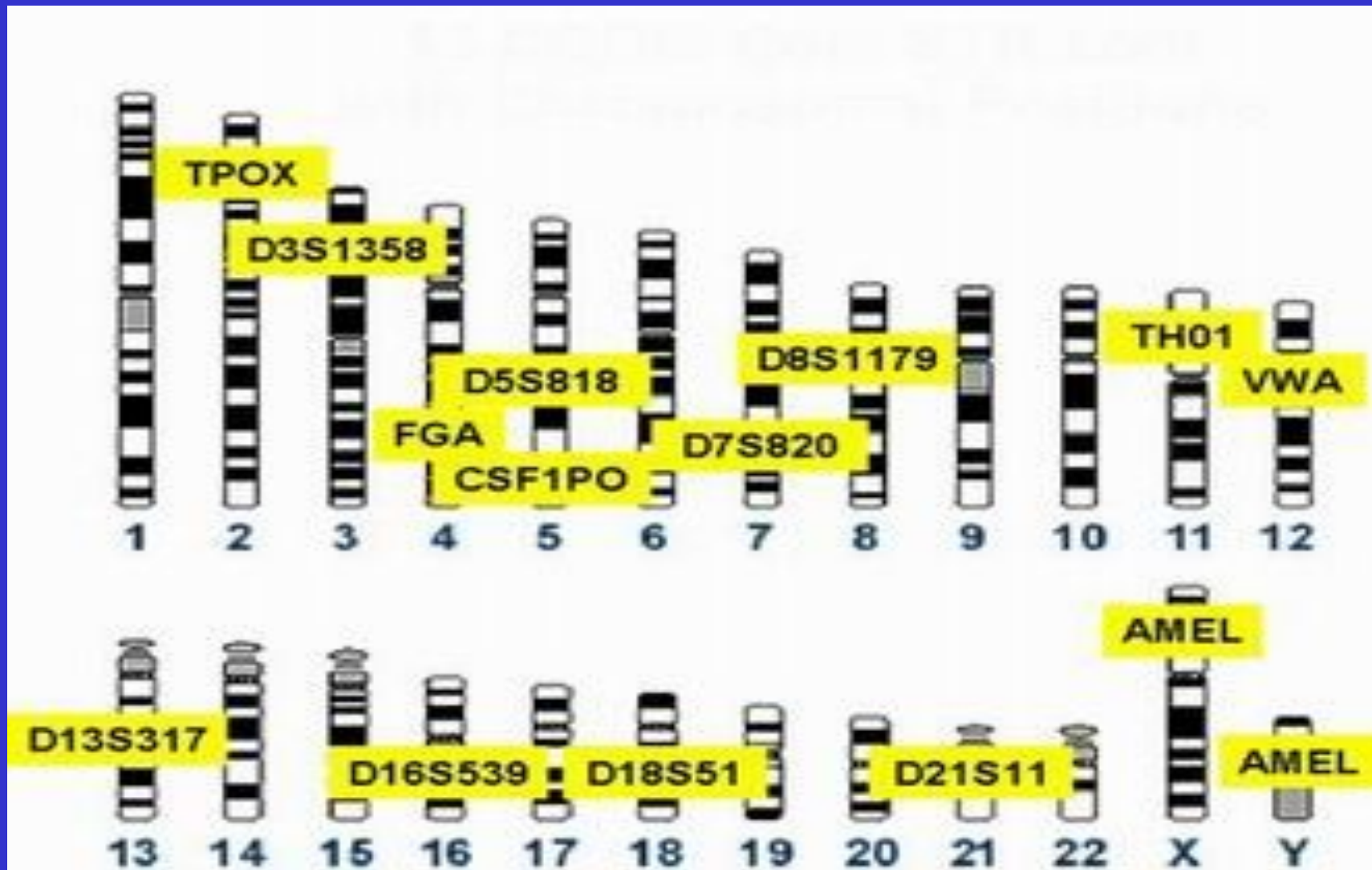
V/Г



A/Г



# Система CODIS



# STR маркери Y-хромосоми

19

388

390 391 392 393

AMH 14

12

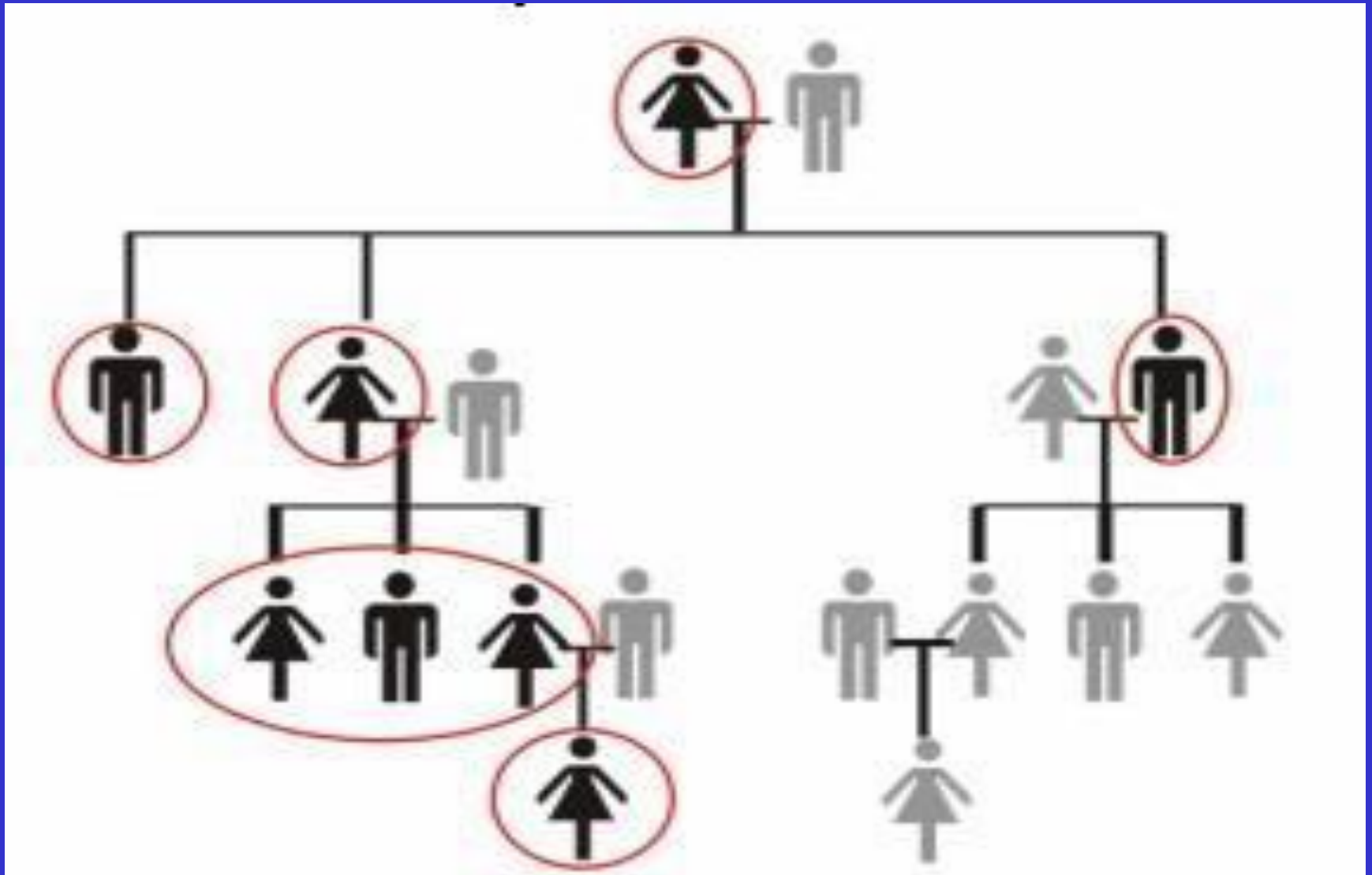
24 11 13 13

# Порівняльний аналіз Y-STR гаплотипів європейських популяцій

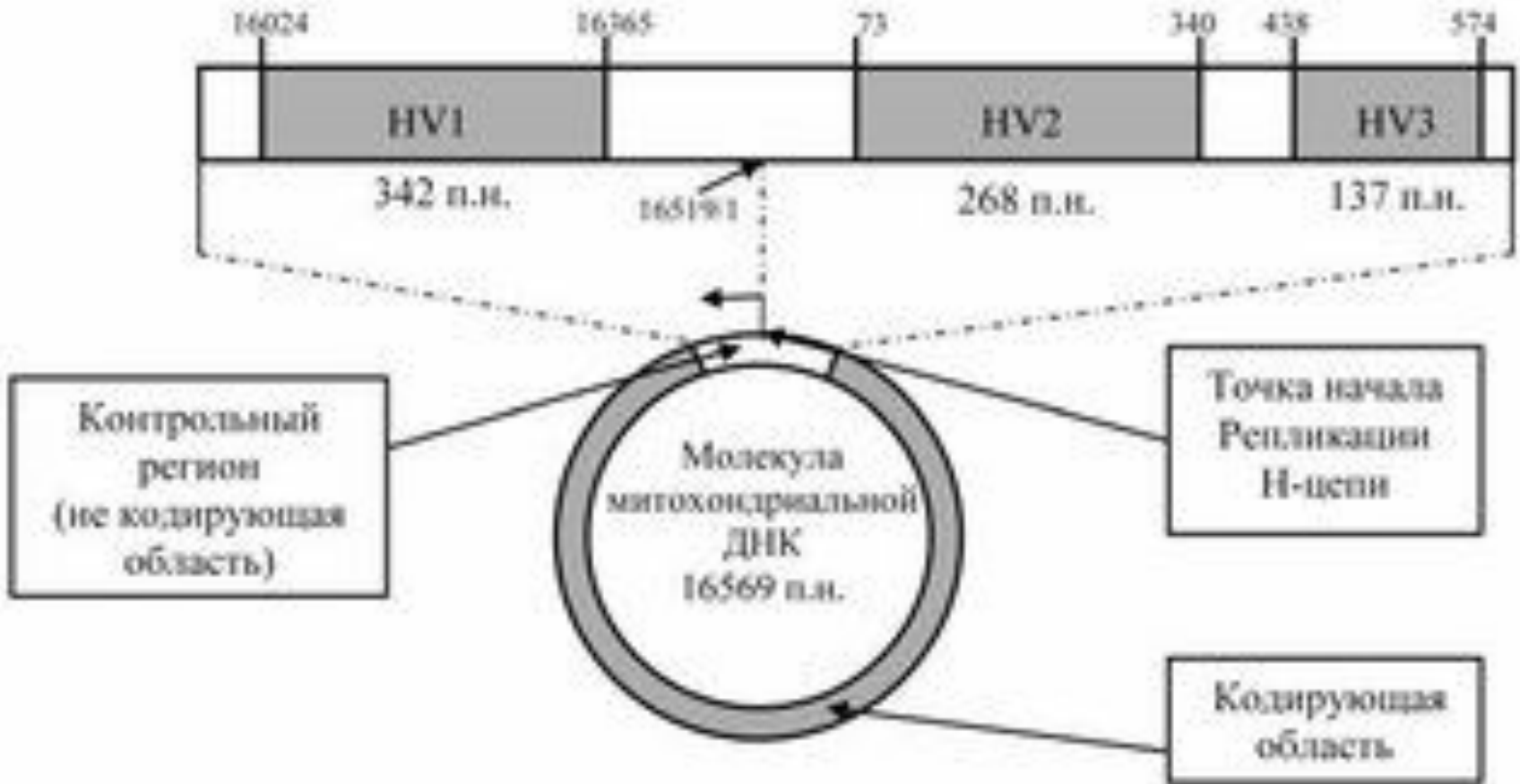




# Успадкування мт-ДНК



# Гіперваріабельні ділянки мт-ДНК (HV)

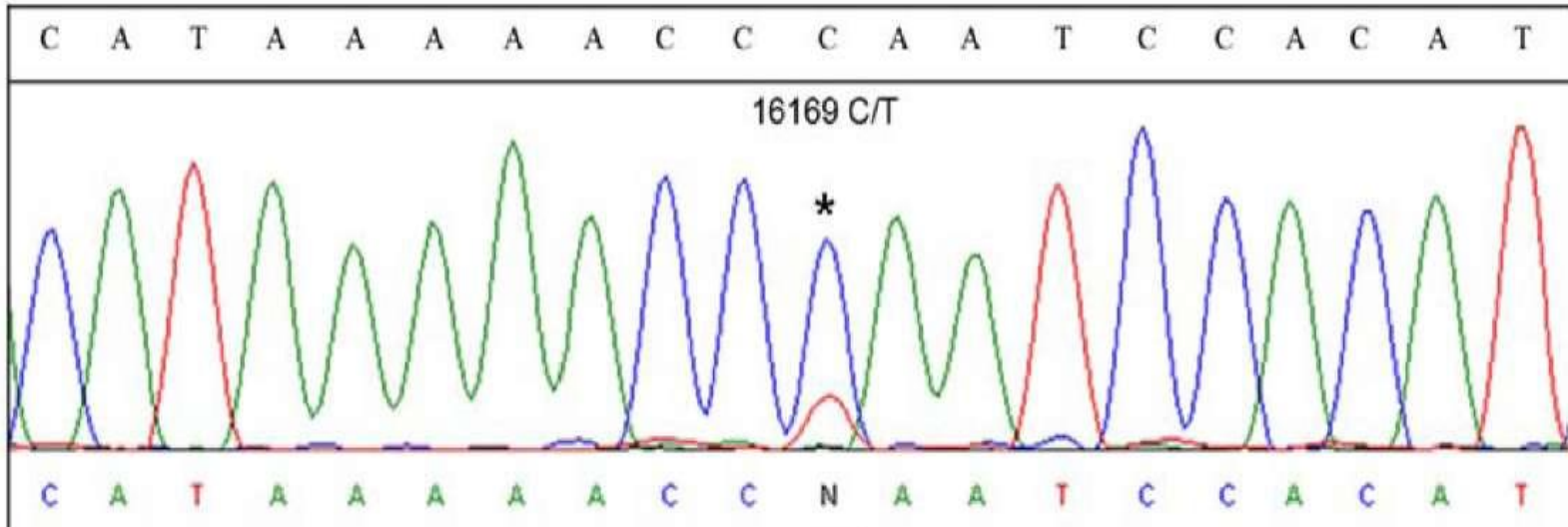


п.н. – пар нуклеотидов



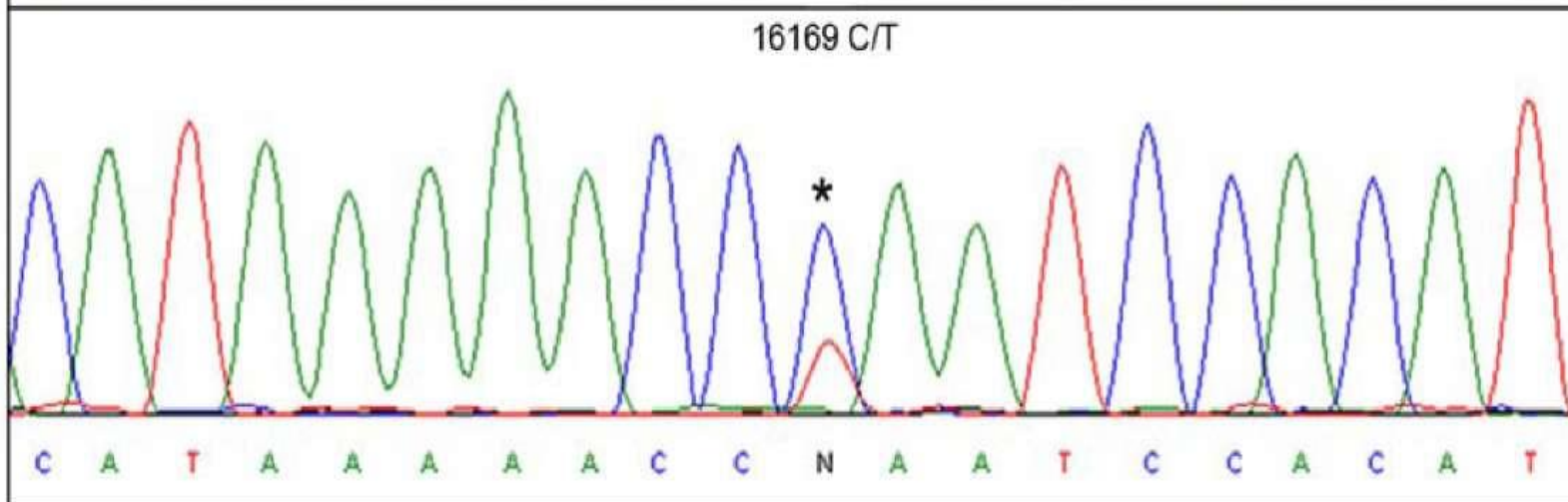
# Порівняння хроматограм мт-ДНК

АС\_000021



Архивные  
пятна крови  
Николая II

Костный  
образец  
N 4-46



**Бажаю успіху!**