



ЕЛЕКТИВНИЙ КУРС

(курс за вибором)

*“ Сучасні проблеми молекулярної
біології ”*

Лекцію підготував — к.б.н.

доцент Павліченко

Віктор Іванович

medbio@zsmu.zp.ua

Запоріжжя

2015

Лекція № 6

Сучасні генні технології

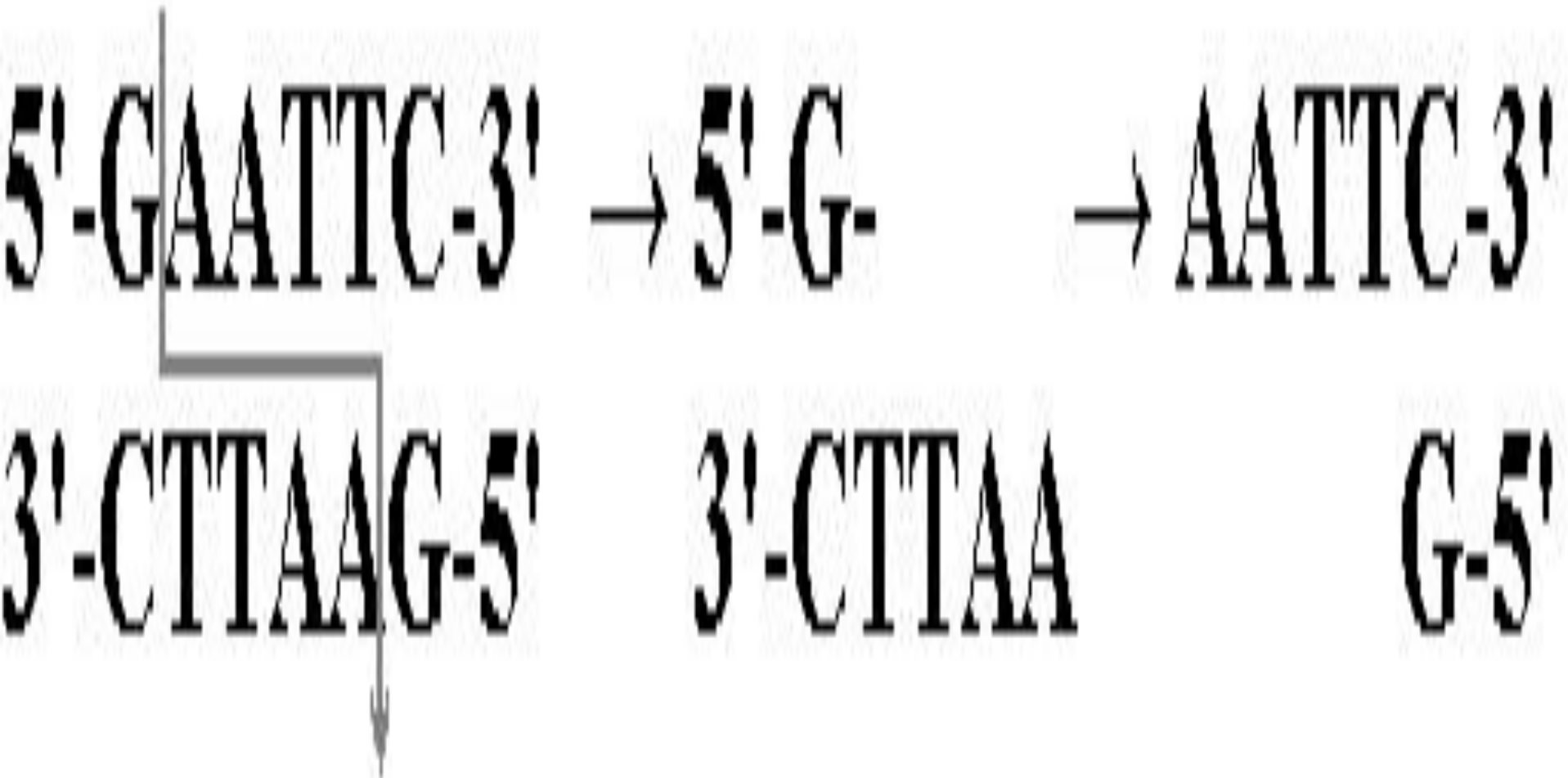
План

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

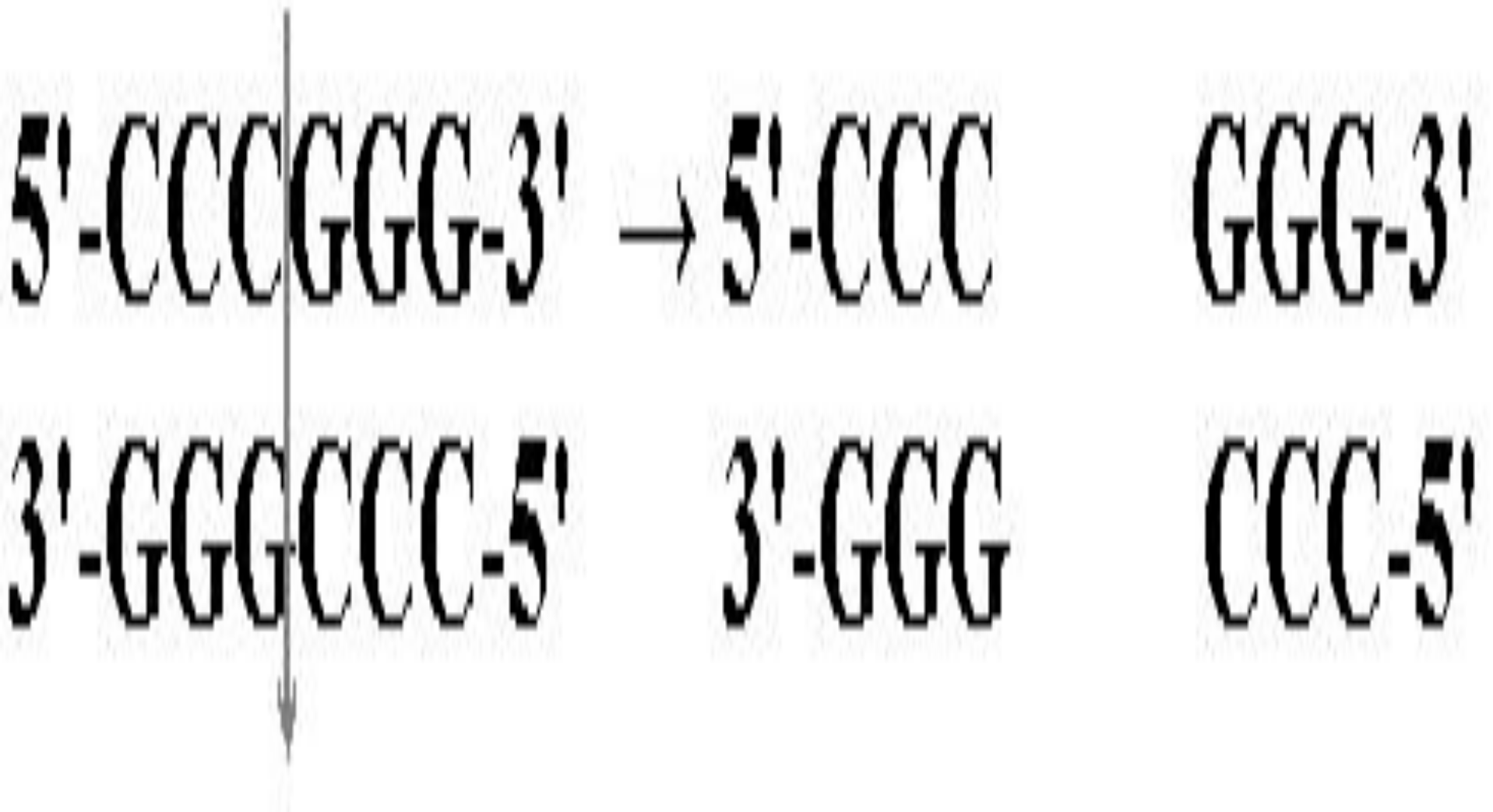
№1 Методи дослідження НК

- 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,
глютенова 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 одонуклеотидні заміни в геномній ДНК
- Сьогодні з допомогою ПЦР діагностують більше 200 успадкованих захворювань, таких як:
 - Фенілкетонурія
 - Муковисцидоз
 - Міодистрофія Дюшенна/Беккера
 - Хорея Гентингтона
 - Гемофілія А, В
 - Більянь 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....

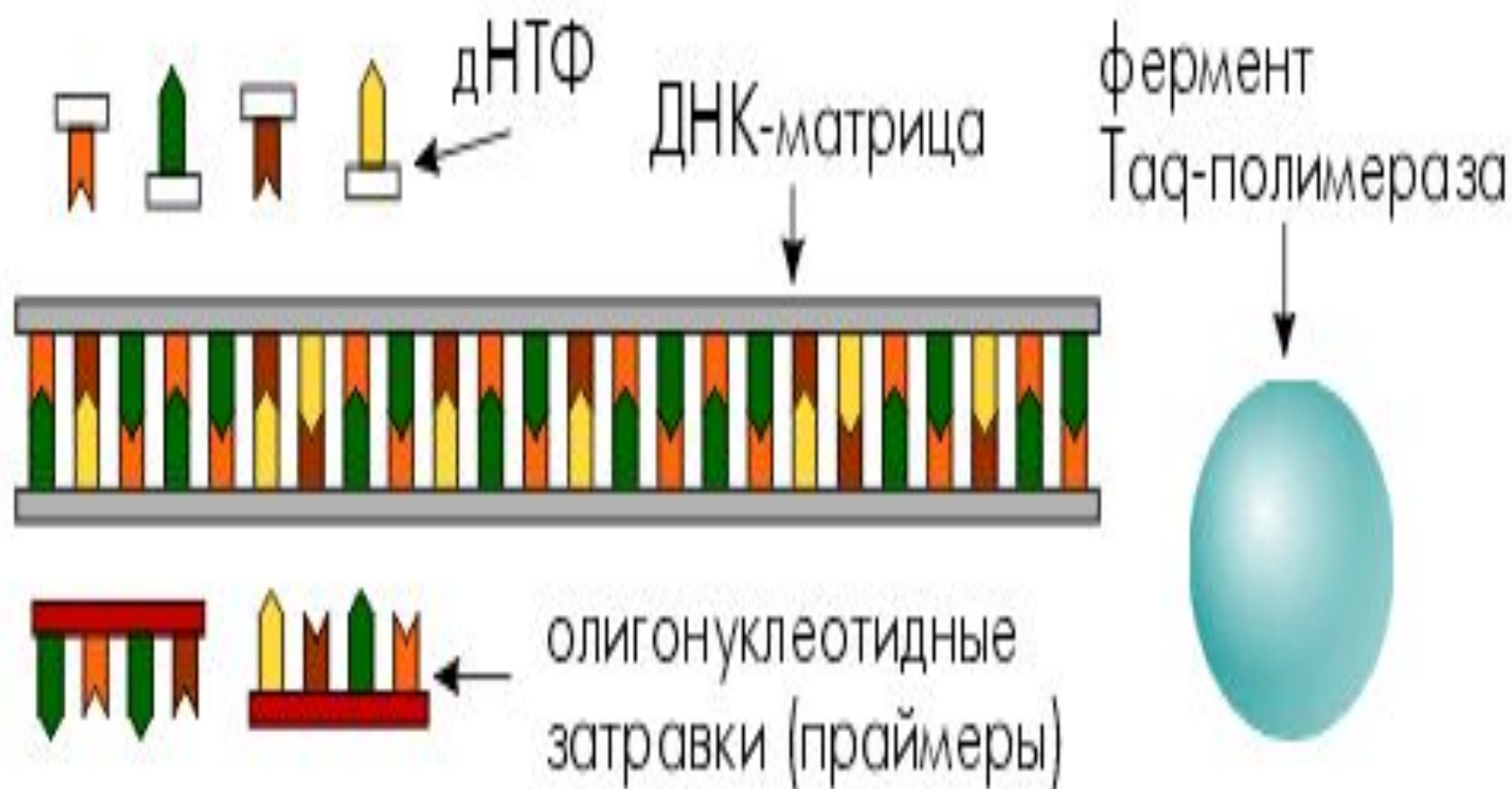
Типова ПЛР-ампліфікація

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.

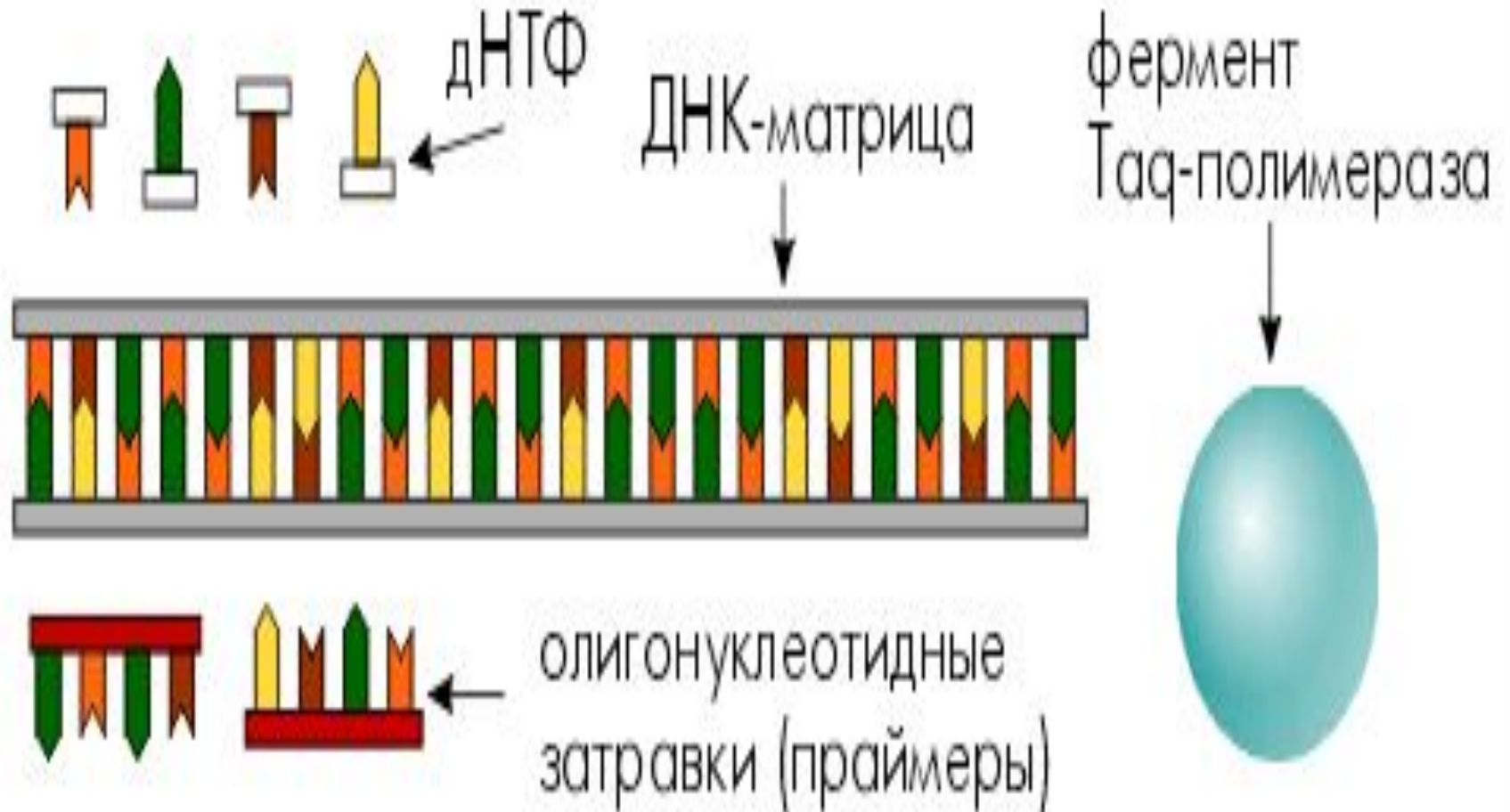
Завдання, що можна вирішувати за допомогою ПЛР

- 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).

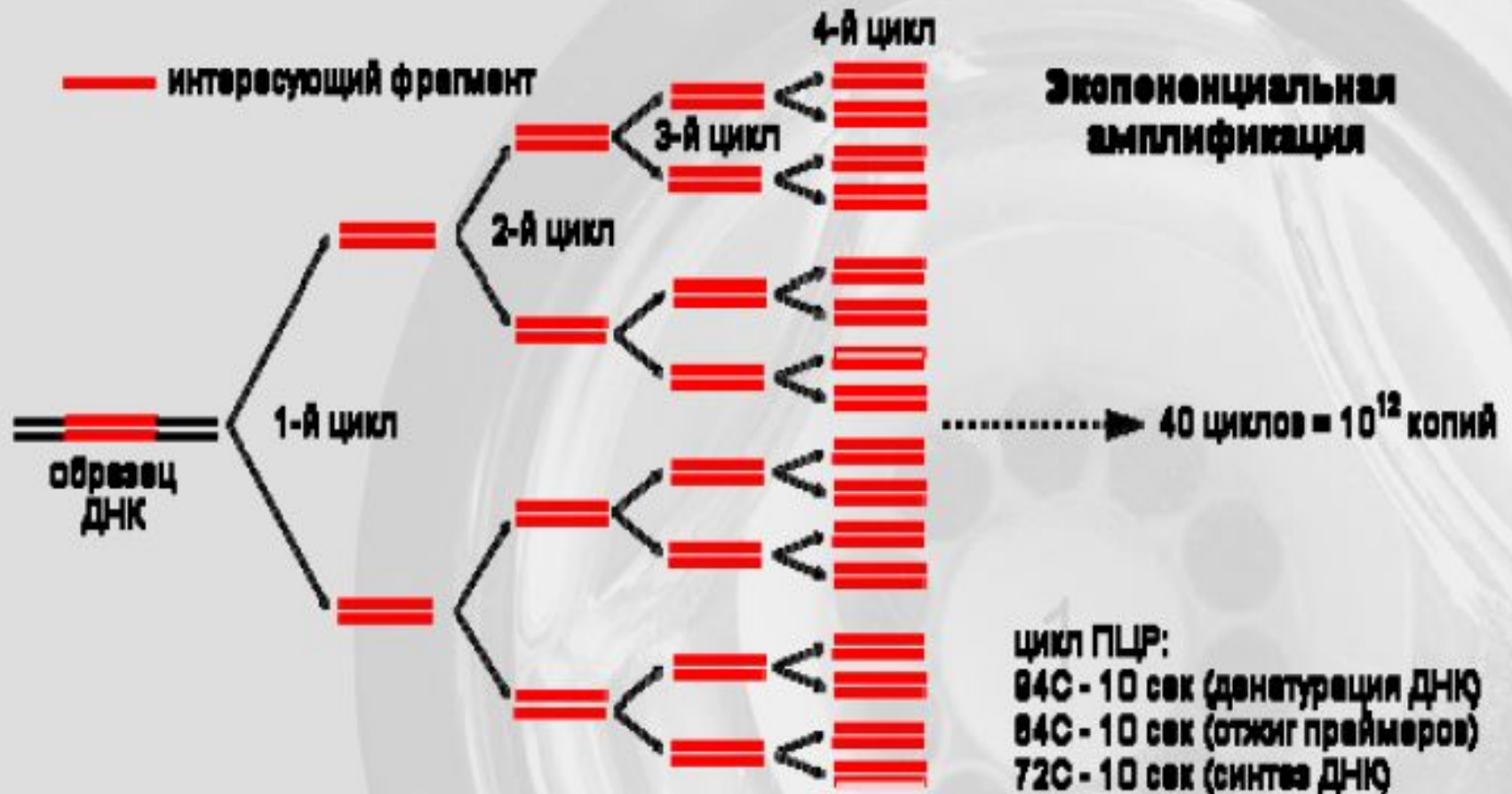


Исходные компоненты ПЦР

Вихідні компоненти ПЛР



Експоненціальна ампліфікація



№ 2 Методи ДНК-діагностики

Непрямі: аналіз конформаційного поліморфізму
1 ланц. ДНК;

градієнтний гель- електрофорез;

секвенування та інші;

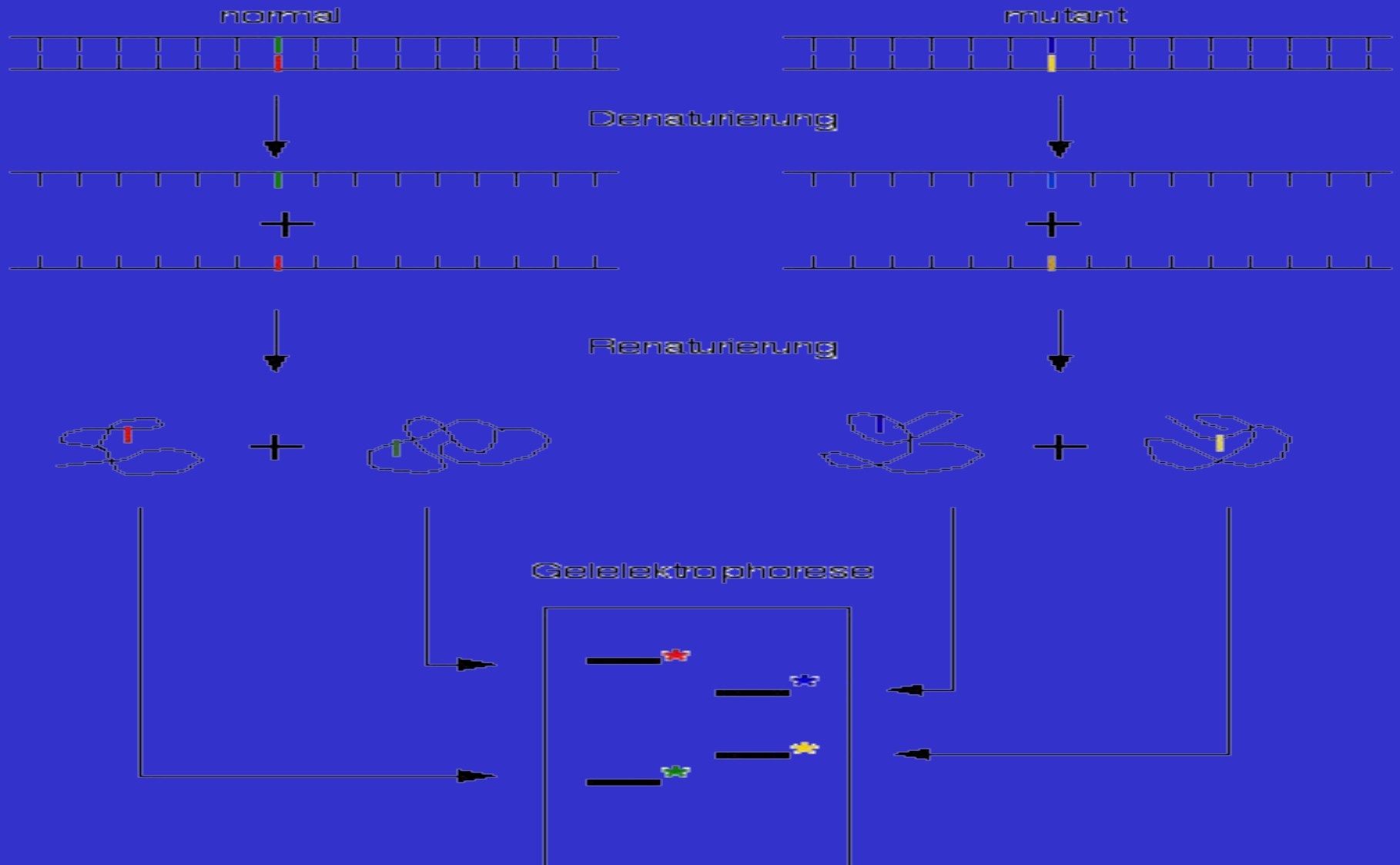
Прямі:

- ПДРФ

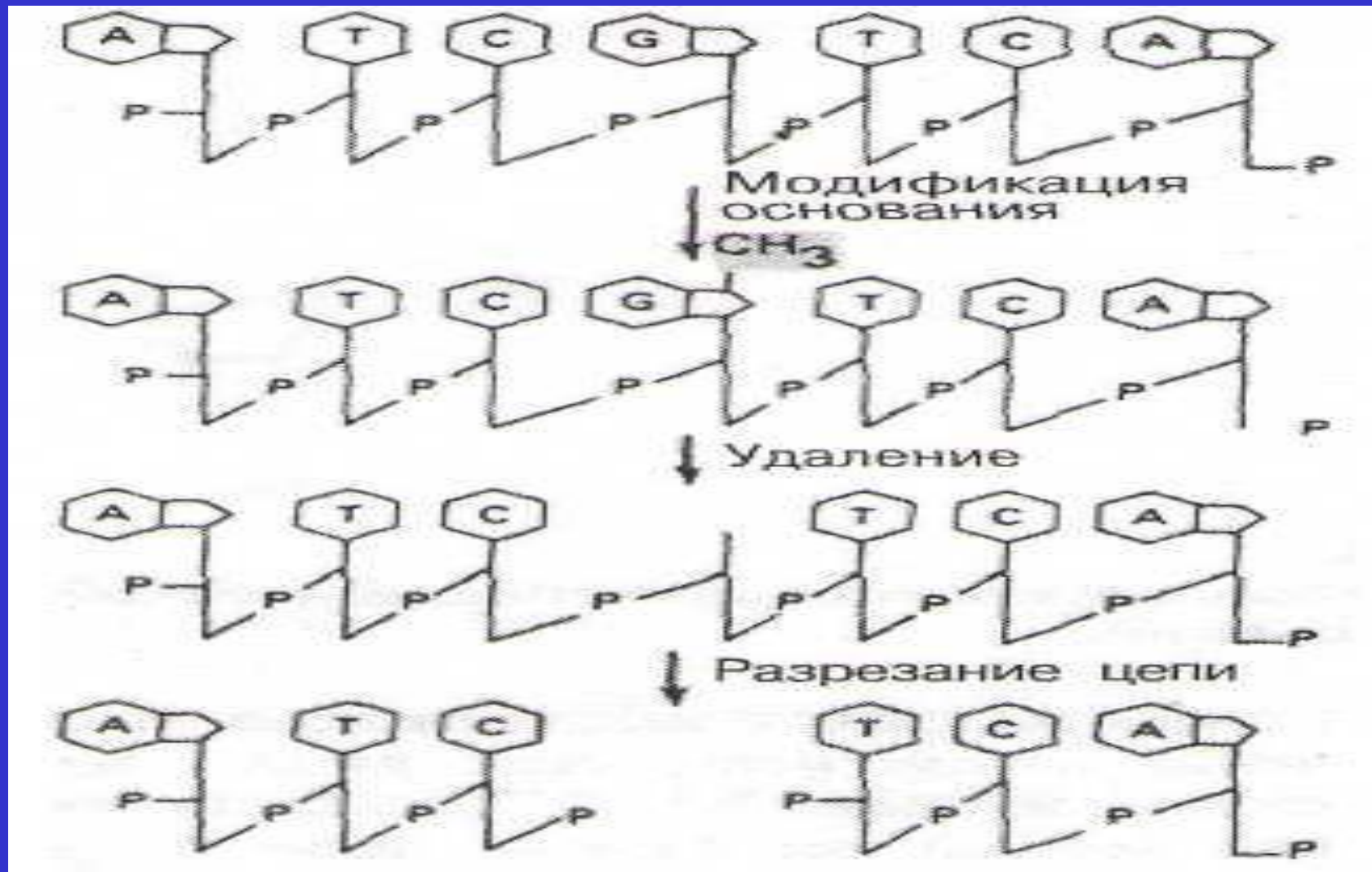
- Аналіз мікросателітів (STR)

- Аналіз мт-ДНК

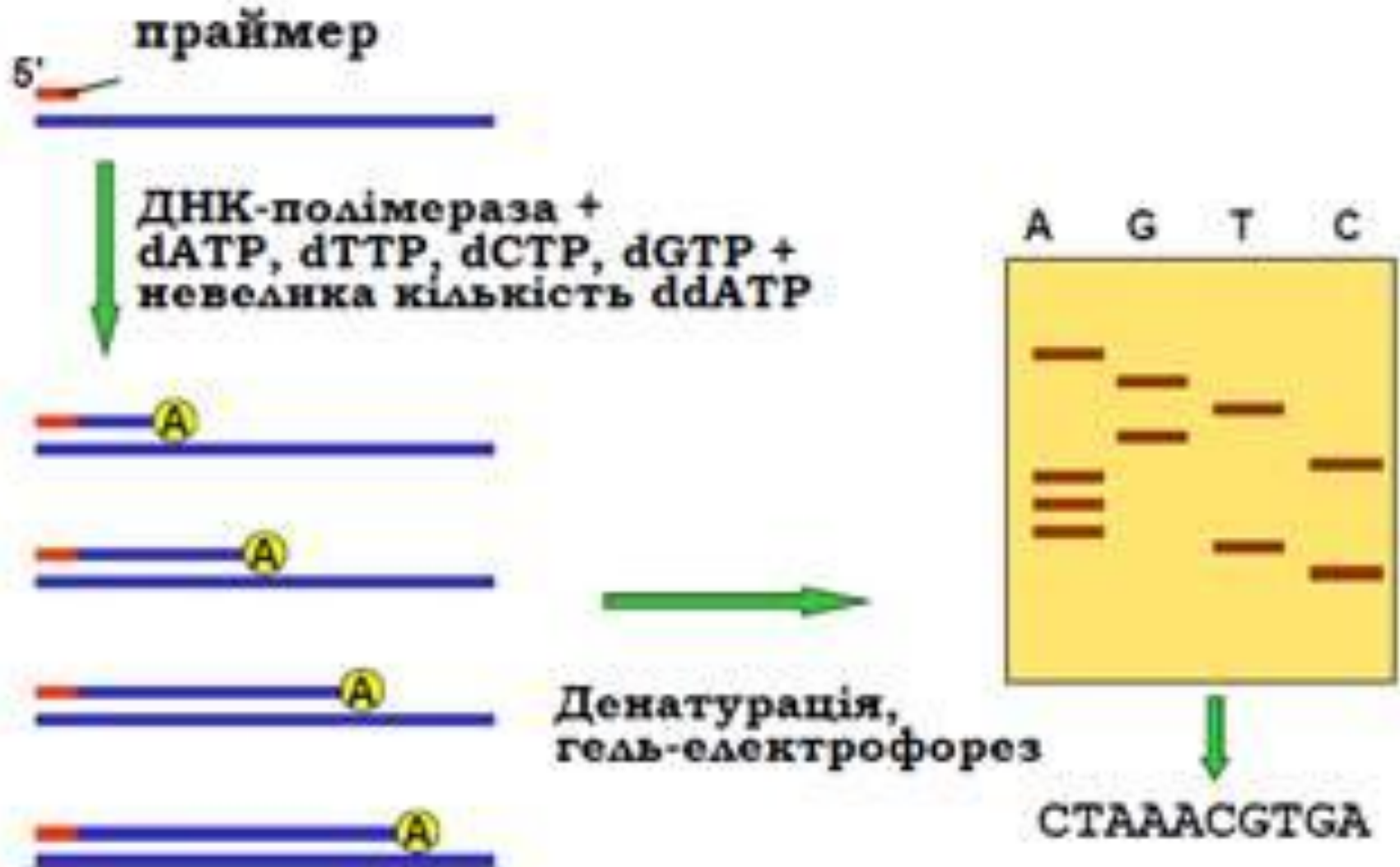
Аналіз конформаційного поліморфізму 1 ланц. ДНК



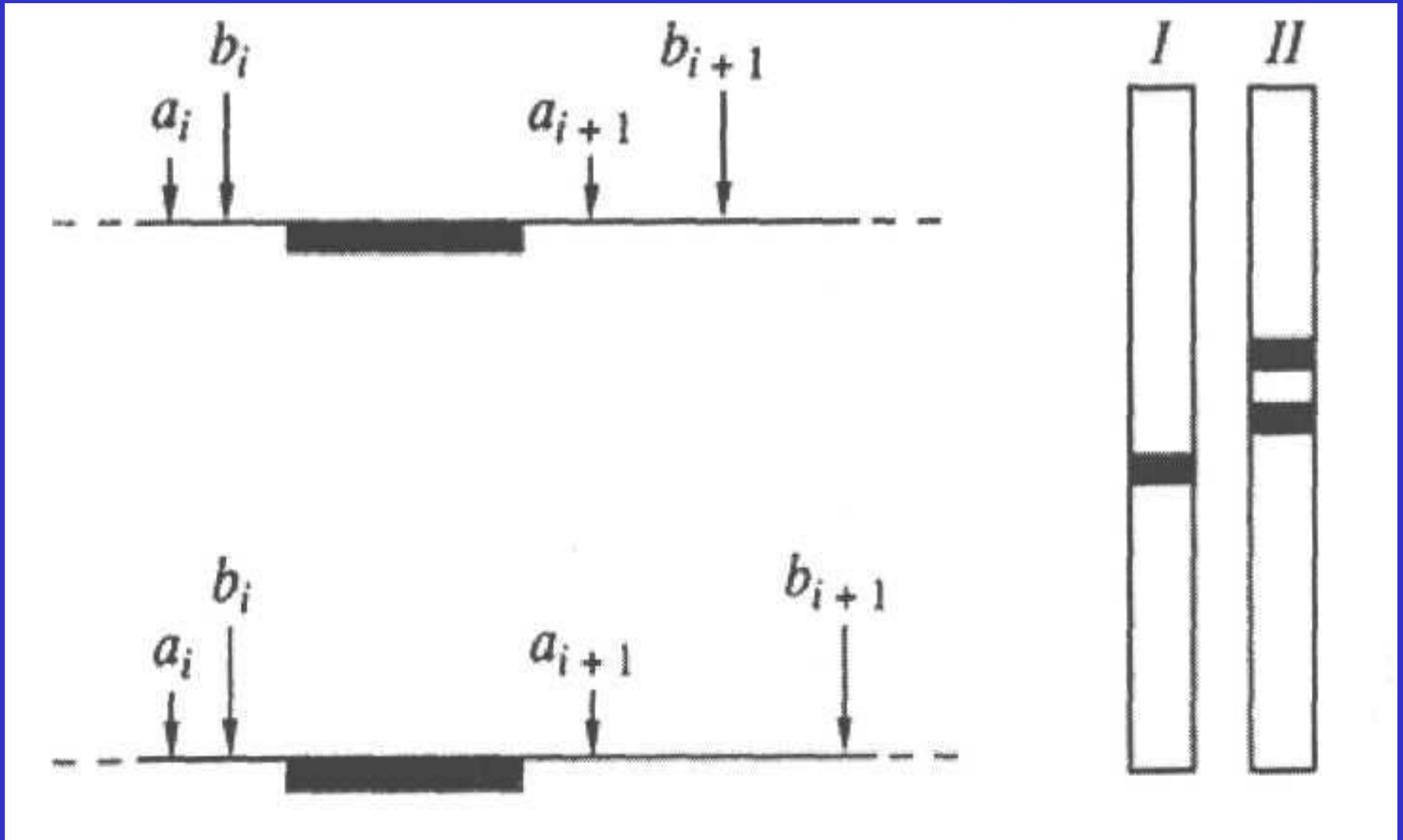
Секвенування ДНК



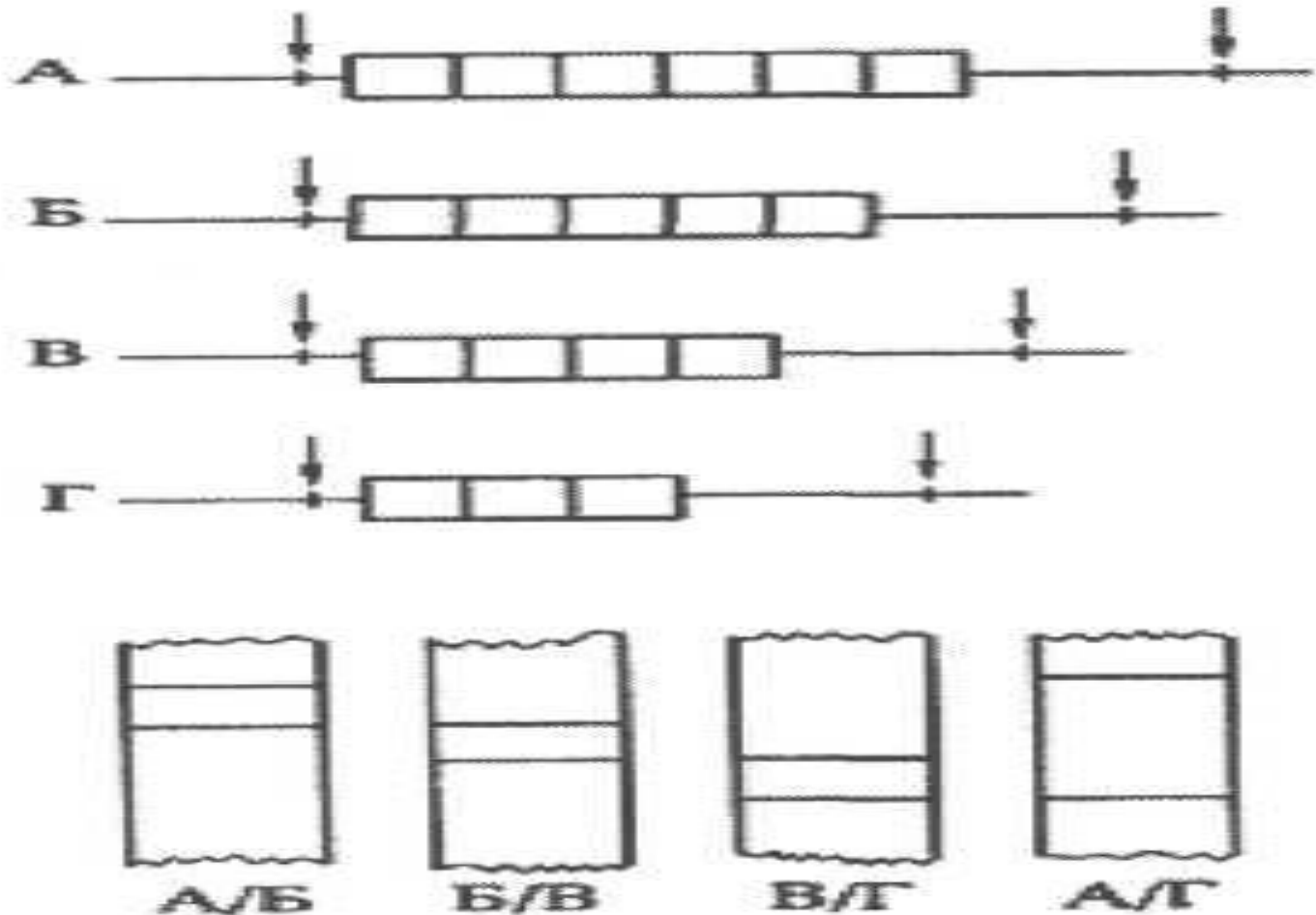
Автоматизація секвенування



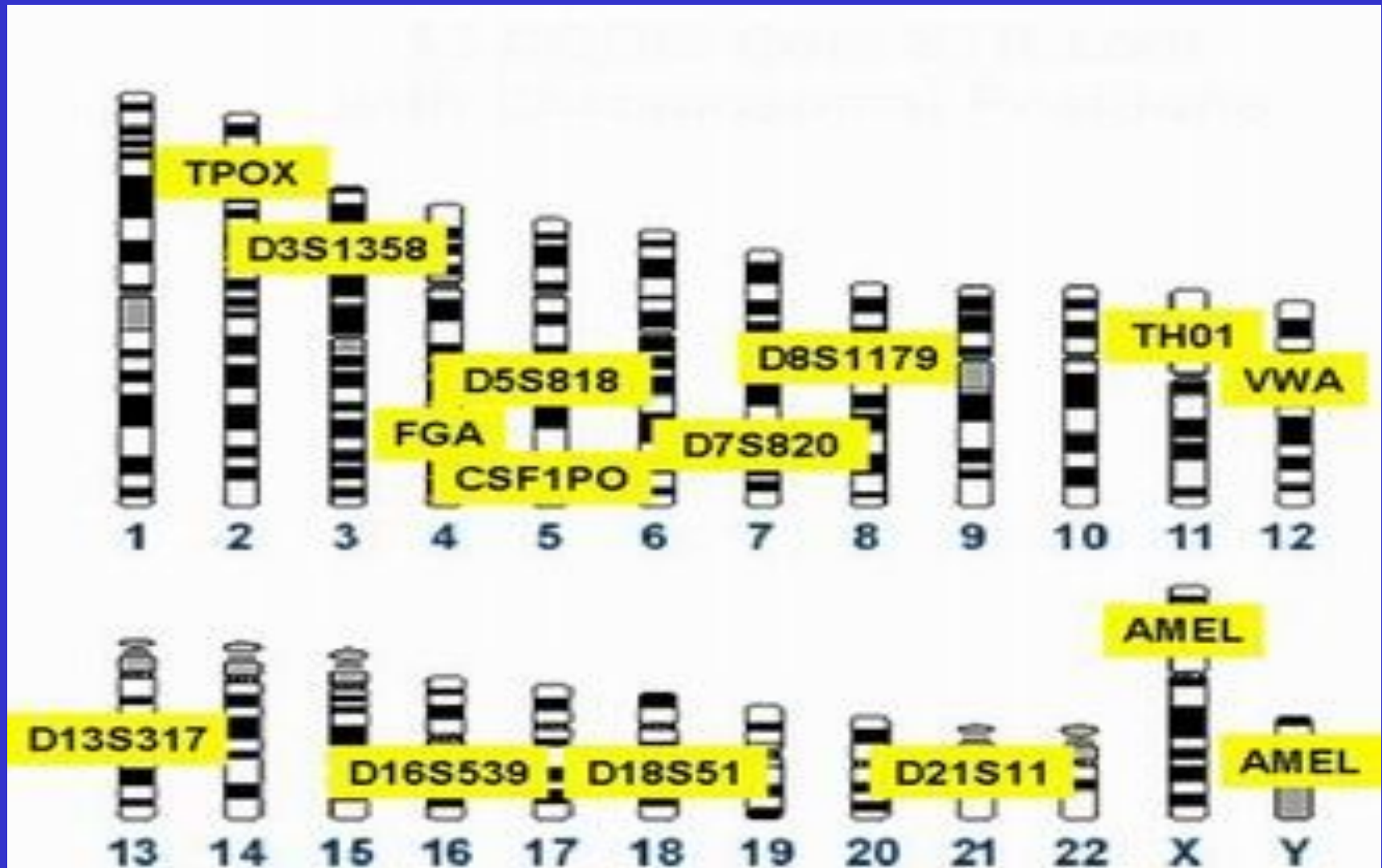
Аналіз довжини рестриктів ДНК (ПДРФ)



Аналіз мікросателітів (тандемних повторів ДНК)



Система CODIS



STR маркери Y-хромосоми

19

388

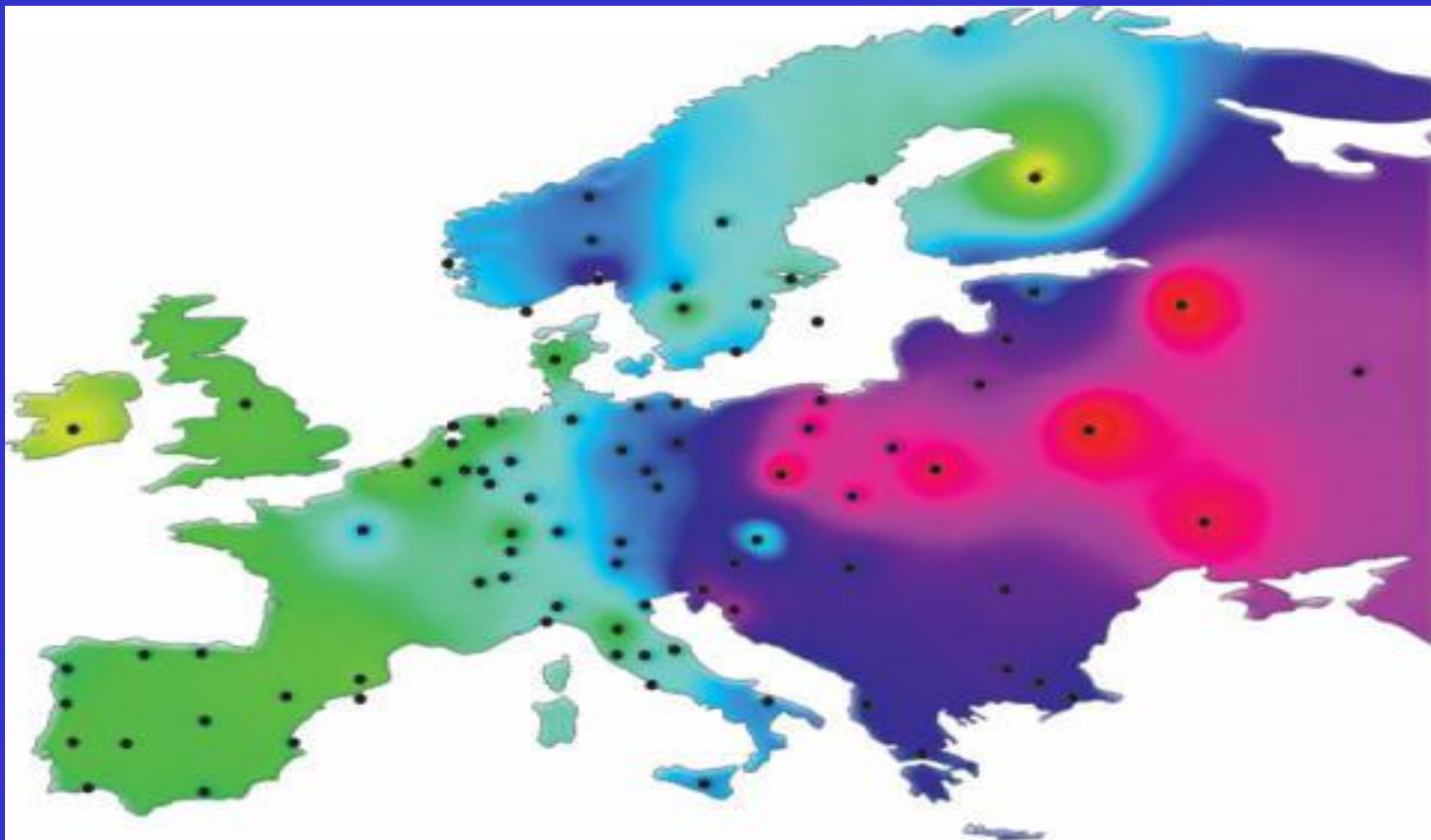
390 391 392 393

AMH 14

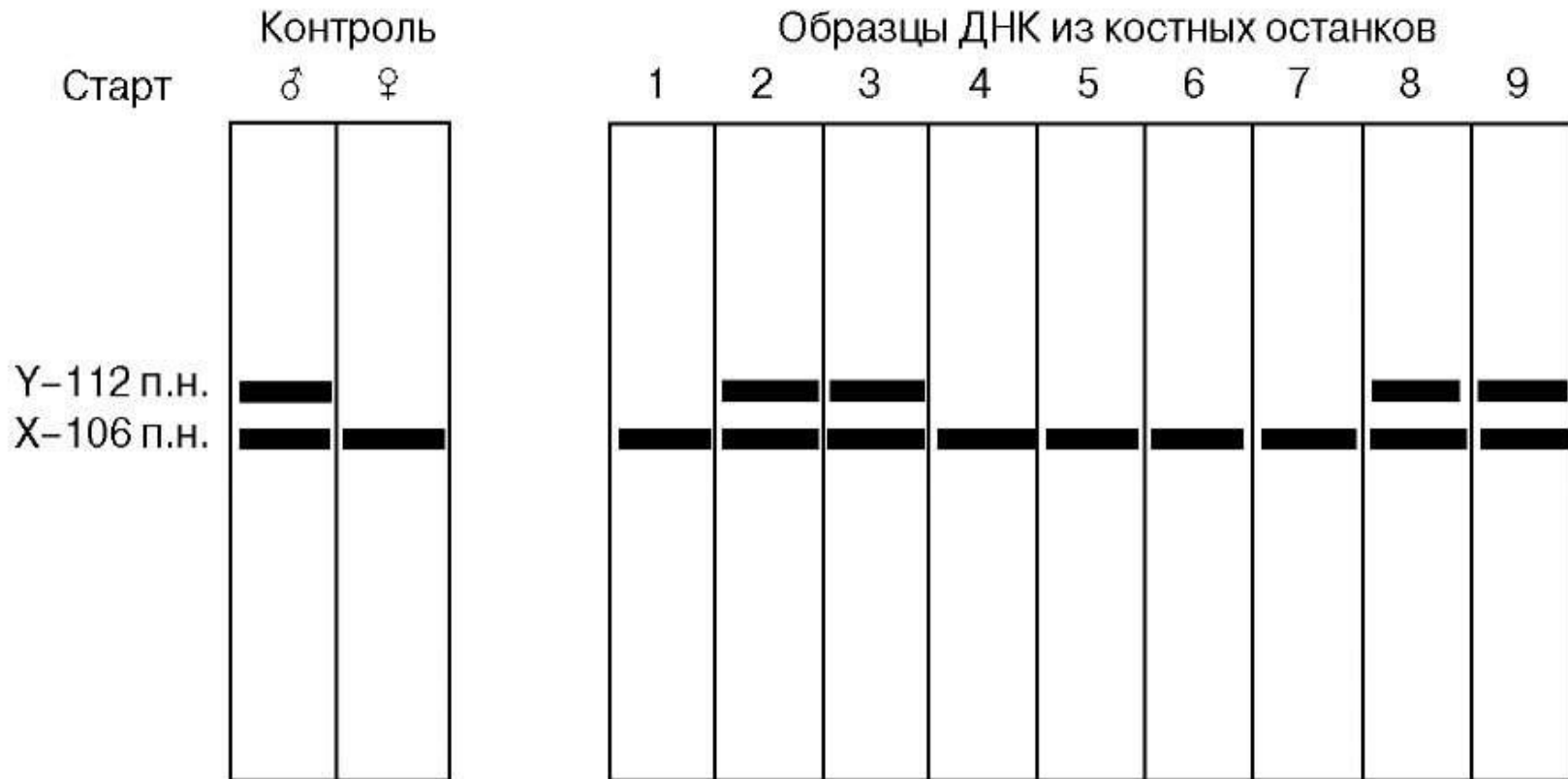
12

24 11 13 13

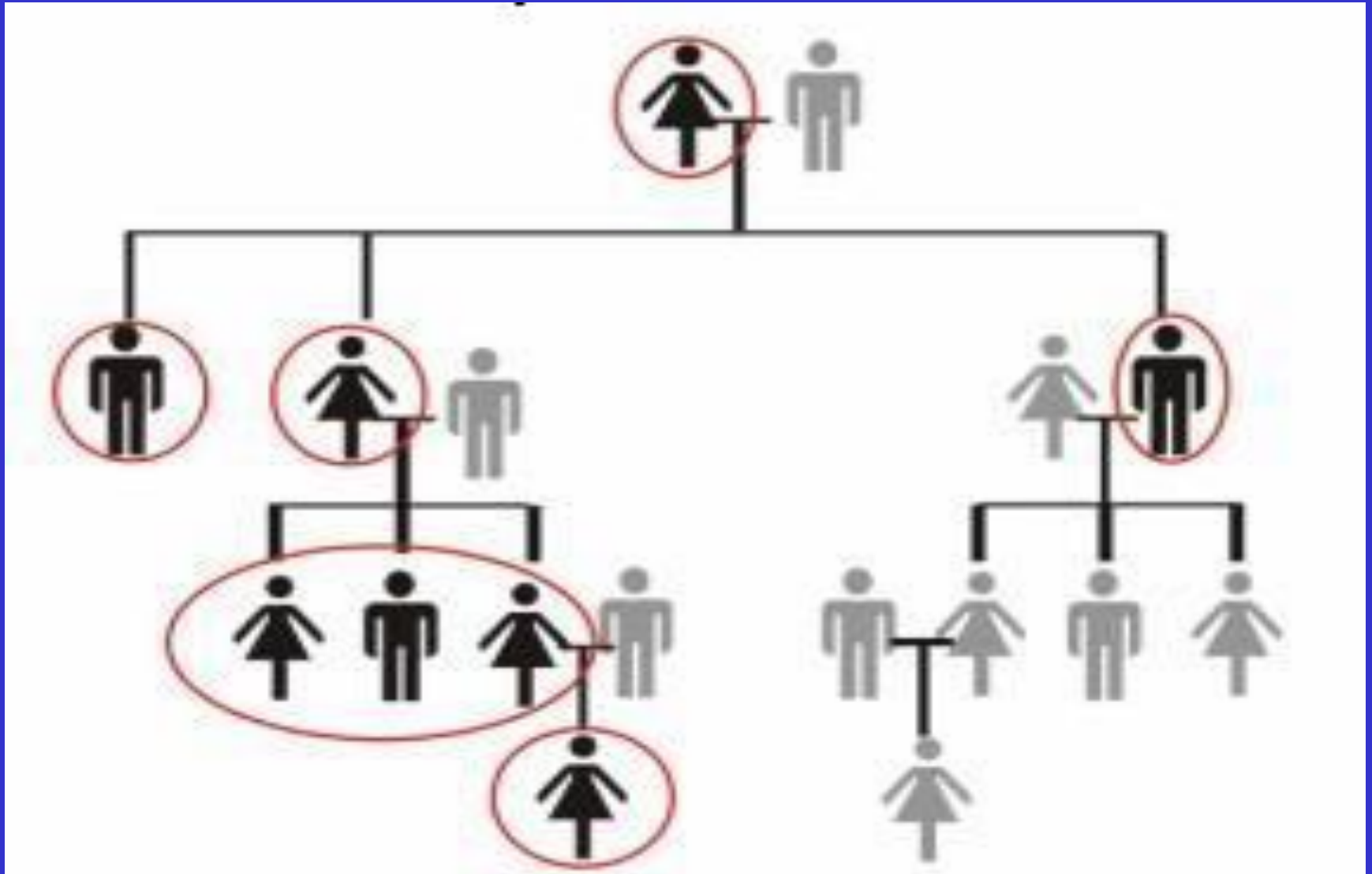
Порівняльний аналіз Y-STR гаплотипів європейських популяцій



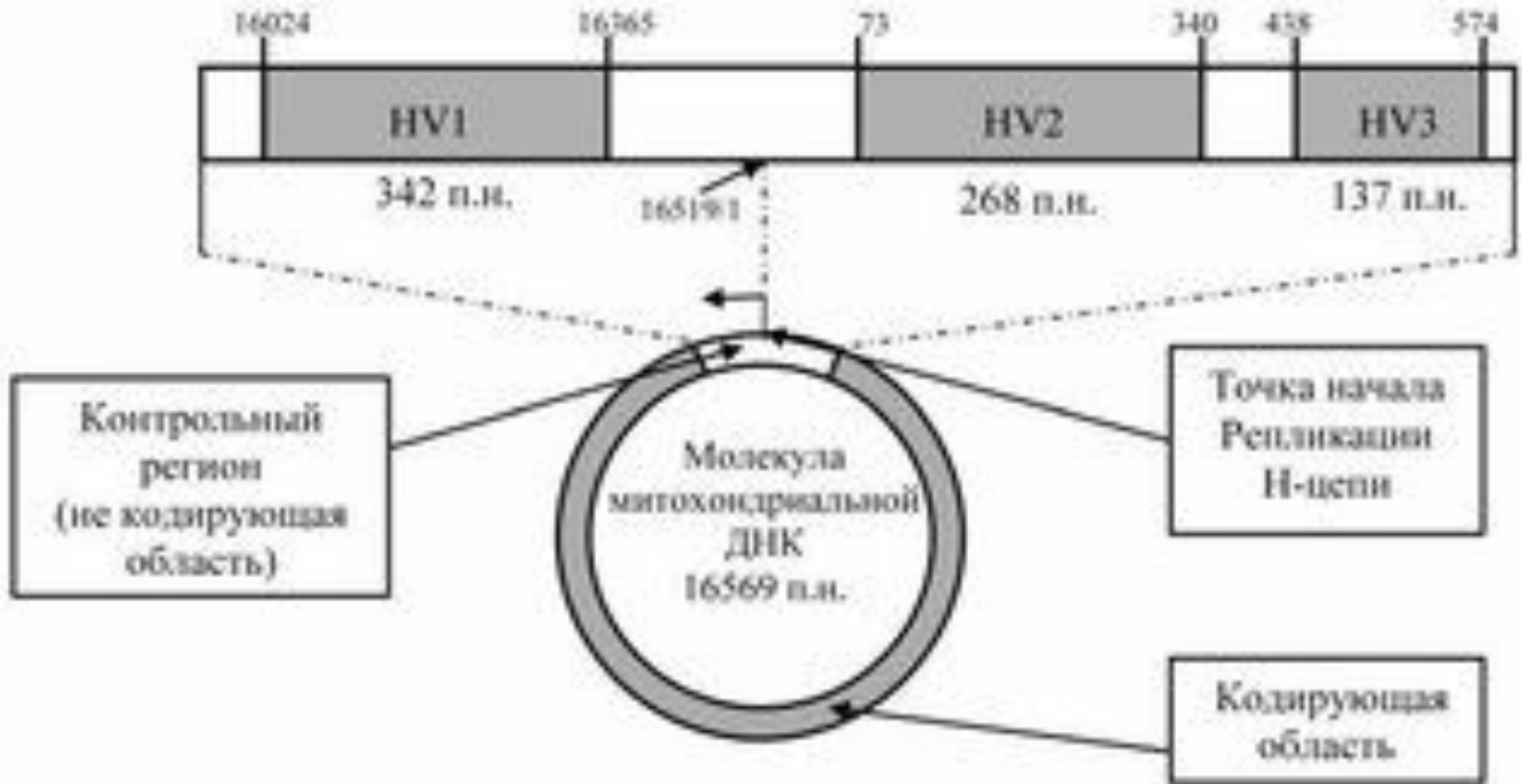
Визначення статі за геном амелогеніну



Успадкування мт-ДНК



Гіперваріабельні ділянки мт-ДНК (HV)

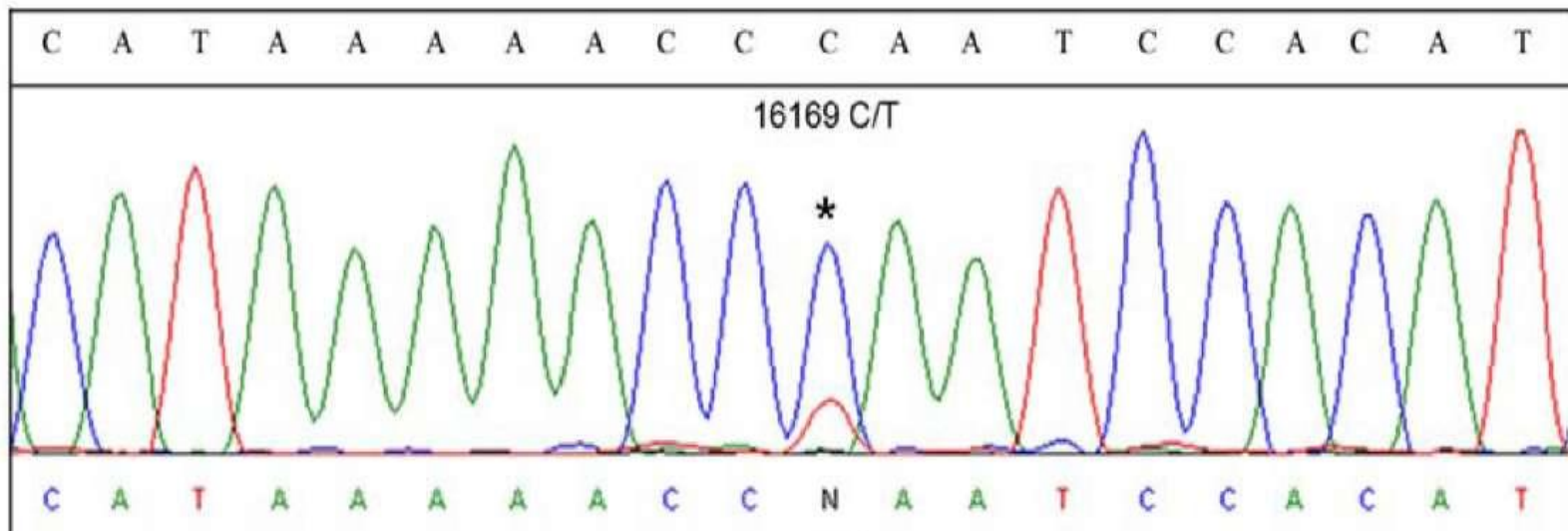


п.н. – пар нуклеотидов

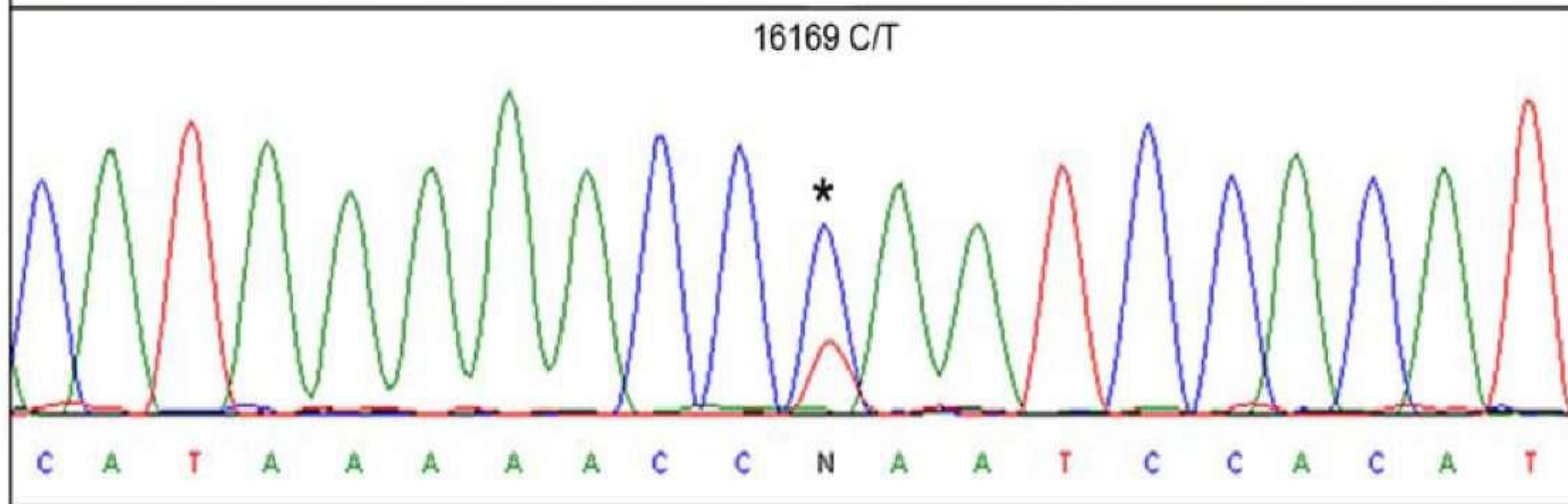
Порівняння хроматограм мт-ДНК

АС_000021

Архивные
пятна крови
Николая II



Костный
образец
N 4-46



Бажаю успіху!