

**ДВНЗ «УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

**Гасинець Я.С., Щубелка Х.М., Вольфсбергер В.В., Кіш Р.Я.,
Вакерич М.М., Кривцова М.В., Мірутенко В.С., Олексик Т.Х.**

**ВСТУП ДО ГЕНОМНОЇ БІОЛОГІЇ
навчально-методичний посібник**

Ужгород – 2023

Гасинець Я.С., Щубелка Х.М., Вольфсбергер В.В., Кіш Р.Я., Вакерич М.М., Кривцова М.В., Мірутенко В.С., Олексик Т.Х. Вступ до геномної біології: навчально-методичний посібник. – Ужгород: вид-во УжНУ «Говерла», 2023. – 42 с.

Навчально-методичний посібник із дисципліни «Вступ до геномної біології» містить короткі теоретичні відомості, тематичний план лабораторних занять та методику їхнього проведення. Зокрема розглядаються методики виділення (екстракції) ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, аналіз ДНК методом гель-електрофорезу, окремі роботи присвячені вивченню механізму утворення і розповсюдження геномного різноманіття, впливу міграції та потоку генів на генетичне змішування, аналіз геномних послідовностей, типи геномних даних тощо. Насамкінець висвітлюється практичне застосування геномних даних, зокрема пропонується ознайомлення з фундаментальними поняттями генетичних компонентів спадкових та негенетичних захворювань, а також з ключовими базами даних генетично важливих мутацій.

Рекомендовано для студентів старших курсів, магістрантів та аспірантів біологічного та медичного профілю, а також науковців та викладачів суміжних дисциплін, лікарів, працівників діагностичних лабораторій.

Рецензенти:

доктор медичних наук, професор Коваль Г.М.
кандидат біологічних наук, доцент Мірутенко В.В.

*Рекомендовано до друку:
методичною комісією біологічного факультету
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»
(протокол № 5 від 26 червня 2023 р.)*

© Я.С. Гасинець, Х.М. Щубелка, В.В. Вольфсбергер, Р.Я. Кіш,
М.М. Вакерич, М.В. Кривцова, В.С. Мірутенко, Т.Х. Олексик, 2023

© ДВНЗ «Ужгородський національний університет», 2023: видання

ЗМІСТ

Передмова	4
<i>Заняття № 1</i>	
Молекулярно-генетична лабораторія, правила роботи в ній. Основні прилади та обладнання.	5
<i>Заняття № 2</i>	
Геномні дані та їх отримання, ресурси і геномні браузері, аналіз геномних послідовностей.	10
<i>Заняття № 3</i>	
Механізми формування і поширення геномного різноманіття. Знаходження та анотація варіацій у малих геномах.	16
<i>Заняття № 4</i>	
Виділення (екстракція) ДНК.	20
<i>Заняття № 5</i>	
Полімеразна ланцюгова реакція.	25
<i>Заняття № 6</i>	
Аналіз ДНК методом електрофорезу в агарозному гелі.	30
<i>Заняття № 7</i>	
Вплив міграції та потоку генів на генетичне змішування. Популяційно-специфічні генетичні маркери. Статистичні тести в популяційній генетиці.	35
<i>Заняття № 8</i>	
Генетичні складові у спадкових та негенетичних захворюваннях. Бази даних із медично важливих мутацій. Робота з інструментами для дослідження варіації геномів.	38
Список використаних джерел	42

ПЕРЕДМОВА

Стрімкий розвиток методів молекулярної біології та біоінформатики за останнє десятиліття призвів до появи геномного підходу при дослідженні біологічних процесів, починаючи від еволюції видів і до профілактики та лікування захворювань людини. Вивчення геномів, геномних варіацій і геномної структури популяцій, карти геномів поступово стають новою точкою відліку досліджень біологічних видів та біорізноманіття загалом: на них базується детальна документація еволюційних процесів у геномах природних видів рослин і тварин, дослідження появи нових і динаміки старих мутацій, виявлення і відслідковування еволюційних і демографічних процесів, пов'язаних з чутливістю виду до навколишнього середовища. Геномні дані надають первинний матеріал для встановлення варіації видових і популяційних генетичних маркерів, визначення геномних слідів природного добору, дослідження і розуміння мікро- та макроеволюційних процесів, адаптацій, з'ясування причин, що ведуть до зникнення окремих видів тощо. В останньому аспекті підвищеної уваги заслуговує вивчення геномних процесів у ендемічних, рідкісних та зникаючих видів. Важливим аспектом геномних досліджень (геноміки) є встановлення ендемічних алелей з фенотипічним ефектом, у т.ч. і хвороботворних і, зокрема, невідомих досі генетичних детермінант хронічних, спадкових та інфекційних захворювань, властивих локальним популяціям людини, що сприяє підвищенню якості клінічної діагностики та дозволяє застосовувати геномні дані в терапевтичних цілях, зокрема, формувати індивідуальний підхід до профілактики та лікування різноманітних захворювань і, врешті, геномні дані стають об'єктивною базою та відправною точкою до формування і розвитку сучасної персоналізованої медицини. На вітчизняних теренах подібні дослідження лише розпочинаються, тому цей навчально-методичний посібник є однією з перших спроб частково заповнити прогалини методологічного забезпечення викладання цієї дисципліни в українському розрізі.

Кожна робота у навчально-методичному посібнику з дисципліни «Вступ до геномної біології» містить перелік обладнання, матеріалів та реагентів, потрібних для її виконання, коротких відомостей, які є теоретичною передумовою того чи іншого лабораторного методу чи методики, поетапного опису операцій чи циклу з поясненням їхньої суті (з візуальним забезпеченням). Детально покроково розписаний хід кожної роботи та прогнозований результат. У посібнику розглядаються методики виділення (екстракції) ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, аналіз ДНК методом гелелектрофорезу, окремі роботи присвячені вивченню механізму утворення і розповсюдження геномного різноманіття, впливу міграції та потоку генів на генетичне змішування, аналіз геномних послідовностей, типи геномних даних тощо. Насамкінець висвітлюється практичне застосування геномних даних, зокрема пропонується ознайомлення з фундаментальними поняттями генетичних компонентів спадкових та негенетичних захворювань, а також з ключовими базами даних генетично важливих мутацій.

Автори сподіваються, що посібник стане у нагоді не тільки здобувачам освіти, але й молодим науковцям, працівникам лабораторій та всім, хто робить перші дослідницькі кроки на нині багатообіцяючому шляху геномної біології.

ЗАНЯТТЯ № 1

ТЕМА: Молекулярно-генетична лабораторія, правила роботи в ній. Основні прилади та обладнання.

МЕТА: ознайомитись із приладами та обладнанням, які використовуються в практиці з геномної біології та сформувані основні навички роботи з ними.

ОБЛАДНАННЯ:

- центрифуги, мікроцентрифуга-вортекс, термошейкер, спектофотометр, автоклав;
- мікропробірки типу епендорф (об'ємом 1,5-2 мл), штативи для пробірок, дозатори змінного об'єму та наконечники з фільтрами до них;
- халат, рукавички, захисні окуляри, маска.

Реактиви: дистильована вода.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Сучасний розвиток геномної біології пов'язаний насамперед з удосконаленням таких класичних та базових у молекулярній біології методів як: центрифугування, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофорез та інше. Базовий набір приладів та обладнання наступний:

1. Одноканальні піпеточні дозатори змінного об'єму (10, 50, 200, 1000, 5000 мкл) – прилади поршневого типу, які використовуються для взяття та внесення точних обсягів біологічних рідин та реактивів при проведенні молекулярно-генетичних досліджень. Разом із дозатором використовуються змінні одноразові наконечники різного об'єму. Крім одноканальних існують багатоканальні піпеточні дозатори, які дозволяють одночасно маніпулювати з багатьма пробами.

Принцип роботи сучасних дозаторів побудований на створенні надлишкового тиску та вакууму у спеціальному наконечнику пристрою за допомогою спеціального поршня, тому дозування у піпеточних приладах поршневого типу здійснюється за рахунок витіснення рідини повітрям і дозування відбувається переміщенням поршня у циліндрі.

2. Центрифуги.

Центрифуга – пристрій, який обертає зразок на високій швидкості для створення доцентрової сили, щоб відокремити різні компоненти від рідини. Використовується для осадження проб, тобто для розділення рідин чи суспензій на фракції з різною густиною (як правило з утворенням осаду і рідкої фази) під дією відцентрової сили.

Лабораторна центрифуга з використанням пробірок зі зразками працює на основі принципу седиментації, при якому доцентрове прискорення, спричинене обертанням центрифуги, змушує більш щільні речовини та частинки рухатися назовні в радіальному напрямку і осідати на дно пробірки (пробірки в роторі при центрифугуванні під впливом відцентрової сили відхиляються в радіальному напрямку дном назовні). Одночасно об'єкти меншої щільності зміщуються і рухаються до центру та піднімаються вгору по пробірці. Тому важливою характеристикою процесу центрифугування є *коефіцієнт седиментації*, який дозволяє визначати вагу молекул. Коефіцієнт седиментації характеризується як відношення швидкості осадження частинок до прикладеного прискорення $S=V/a$ та вимірюється у сведбергах (S). При центрифугуванні більш важкі частки осідають швидше і мають більші значення коефіцієнта седиментації (рис. 1.1). Таким чином, чим більша швидкість центрифугування, тим легші частинки потрапляють до осаду.

Центрифуги класифікують за:

- 1) *швидкістю*: низькошвидкісні (працюють на максимальній швидкості 4000-5000 об/хв), високошвидкісні (15,000-30,000 об/хв) та ультрацентрифуги (можуть досягати 150,000 об/хв);
- 2) *розміром лунок для пробірок зі зразками*: мікроцентрифуги (розраховані на мікропробірки 1,5-2 мл) та настільні центрифуги (англ. benchtop centrifuges), які зазвичай

вміщують більші пробірки. Часто настільні центрифуги мають змінні насадки для пробірок різного розміру, спеціальних ПЛР тарілок, а також адаптації до швидкості обертання.

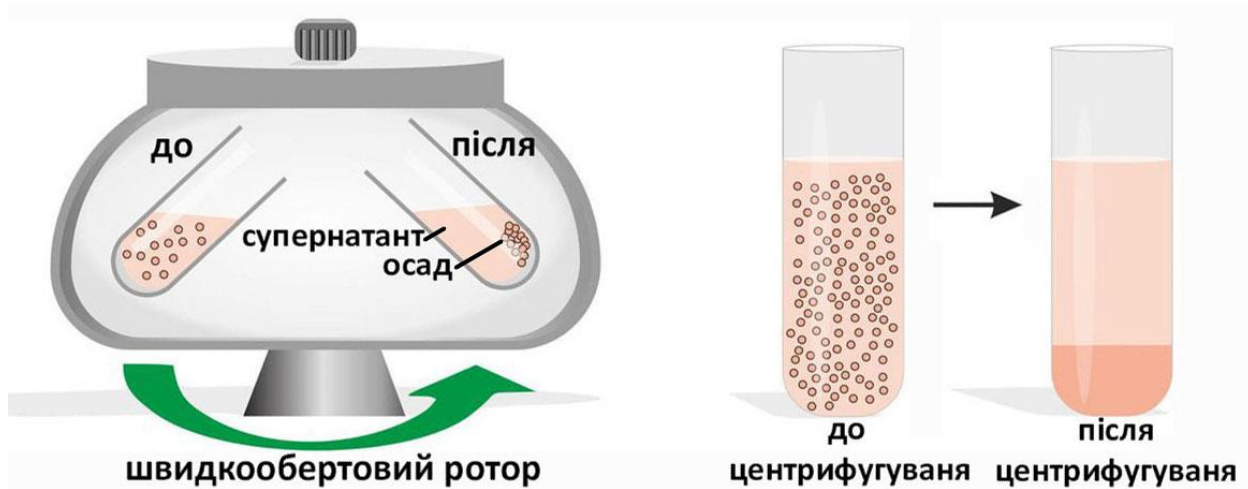


Рис. 1.1. Принцип центрифугування.

Існують центрифуги з можливістю регуляції температури в камері ротора. До прикладу, центрифуги з охолодженням використовуються в молекулярній біології для різних процесів, які потребують збереження структури біологічних матеріалів при низьких температурах. Такі центрифуги дозволяють відокремлювати різні компоненти біосуміші, зберігаючи їх у нативному вигляді, що важливо при роботі з чутливими біологічними матеріалами. Використання охолодження також допомагає зменшити вплив хімічних та біохімічних чинників (наприклад, каталітичних ензимів), які можуть впливати на реакцію та результати експерименту.

Так, у протоколі виділення плазмідної ДНК з бактерій застосовується центрифуга з охолодженням, щоб зберегти цілісність ДНК та відокремити її від інших компонентів бактеріального лізату. Також центрифуги з охолодженням використовуються при виділенні РНК із клітинних лізатів для захисту її від впливу рибонуклеаз та уникнення деструкції.

Основні параметри, які потрібно налаштувати на центрифугу для ефективної сепарації макромолекул, включають наступне:

- *швидкість обертання* центрифуги повинна бути налаштована залежно від об'єму зразка та типу центрифуги. Зазвичай, для виділення ДНК із малих об'ємів рідини використовують мікроцентрифуги з високою швидкістю обертання;
- *час центрифугування* повинен бути достатнім для того, щоб відокремити ДНК від інших компонентів зразка. Зазвичай, для зразків крові або м'яких тканин час центрифугування становить від 10 до 20 хвилин. Для відділення макромолекул час центрифугування є коротшим і складає переважно 2-5 хвилини при високій швидкості;
- *температура* повинна бути налаштована залежно від типу зразка та типу центрифуги. Для більшості зразків використовують температуру від 4 до 25°C;
- *розмір пробірок*, в яких проводяться експерименти, повинен бути налаштований залежно від об'єму зразка та типу центрифуги. Для зразків об'ємом 0,2-1 мл використовуються мікропробірки, а для об'ємів від 10 до 50 мл – конічні пробірки з широким горлом.

Швидкість центрифуги може виражатися в двох основних одиницях:

- *RPM* або швидкість у обертах за хвилину (англ. revolutions per minute) – одиниця вимірювання частоти обертання: числа повних обертів, здійснених ротором центрифуги навколо фіксованої осі.

- **RCF** (відносна відцентрова сила, англ. relative centrifugal force або g-force) – сила, яка прикладається до зразка під час центрифугування, вона пропорційна як радіусу, так і квадрату швидкості обертання.

Часто центрифуги мають можливість переключення швидкості у цих двох одиницях. Проте, якщо такої опції немає, для переводу RPM у RCF, знадобиться вимір радіуса ротора та швидкість ротора у обертах за хвилину (RPM). Тому, щоб перетворити кількість обертів за хвилину (RPM) у відносну відцентрову силу (RCF), або силу g, скористайтеся такою формулою: **RCF (g) = (RPM)² × 1,118 × 10⁻⁵ × r**, де r – радіус ротора в сантиметрах. Наприклад, якщо ваша центрифуга має радіус ротора 10 см і обертається зі швидкістю 5000 об/хв, RCF буде:

$$RCF = (5000)^2 \times 1,118 \times 10^{-5} \times 10 = 2795.$$

3. Мікроцентрифуга-вортекс – вібраційний струшувач, який застосовується для збовтування, струшування та перемішування будь-яких біологічних рідин та розчинів у пробірках. Прилад володіє плавним регулюванням швидкості обертання ротора до 2000 g і може мати два змінних ротора на 12 місць для мікропробірок 0,5 мл і 1,5 мл і спін модуль (струшувач).

4. Термошейкер для мікропробірок і ПЛР планшетів – прилад для інтенсивного перемішування зразків у мікропробірках в умовах термостатування. Функції нагрівання (до +100°C) і перемішування виконуються як одночасно, так і незалежно, тобто в термошейкері реалізовано одночасно три прилади: шейкер, термостат, термостатуючий шейкер. Використовується для прободготовки аналізу ДНК, екстракції білків, полісахаридів, ліпідів та інших клітинних компонентів.

5. Спектрофотометр – лабораторний прилад, який вимірює кількість світла, поглиненого зразком, і використовується для визначення таких властивостей, як концентрація або характер поглинання речовин. Спектрофотометр складається з двох основних компонентів: спектрометра та фотометра. Спектрометр випромінює світло потрібної довжини хвилі, яке проходить через зразок, тоді як фотометр вимірює кількість світла, поглиненого розчином. Порівнюючи інтенсивність падаючого світла з інтенсивністю світла, яке пройшло через зразок, спектрофотометр може надати цінну інформацію про властивості зразка, що аналізується.

Загалом, спектрофотометр – універсальний лабораторний прилад, який використовується для вимірювання поглинання світла речовиною та визначення різних характеристик, таких як концентрація певної речовини у розчині.

Основним призначенням спектрофотометра є вимірювання кількості світла, поглиненого зразком. Це досягається шляхом пропускання світлового променя через зразок, а потім вимірювання інтенсивності цього світлового променя після його взаємодії зі зразком (і часткового поглинання світла). Цю інформацію можна використовувати для визначення різних характеристик зразка, таких як його концентрація або ступінь поглинання певної довжини хвилі світла.

На практиці методи спектрофотометра часто використовуються для вимірювання концентрації різних розчинених речовин у розчині.

6. Автоклав – герметичний пристрій, принцип роботи якого заснований на стерилізації вологим жаром за допомогою пари, яка перебуває під тиском. Тому основною умовою стерилізації в автоклаві є застосування високої температури та тиску для ефективного знищення шкідливих організмів, присутніх у матеріалі, що стерилізується.

За нормального атмосферного тиску вода кипить при 100°C. Однак при підвищенні тиску температура кипіння води також підвищується. В автоклаві тиск підвищується, що дозволяє воді досягти точки кипіння 121°C при тиску 775 мм рт.ст. Вища температура сприяє досягненню ефективної стерилізації. З іншого боку підвищений тиск у камері автоклава забезпечує швидке проникнення тепла в матеріал, що стерилізується. Під час процесу стерилізації водяна пара контактує з поверхнею матеріалу, вивільняючи

приховане тепло та ефективно знищуючи мікроорганізми. Конденсована рідина забезпечує вологе знищення мікроорганізмів, підвищуючи ефективність стерилізації.

Після завершення фази стерилізації тиск всередині камери скидається через свисток або напірний клапан. Тиск поступово повертається до зовнішнього тиску, тоді як стерилізовані компоненти всередині автоклава залишаються гарячими протягом певного періоду.

ХІД РОБОТИ

1. Ознайомитись з технікою безпеки при роботі у лабораторії.

При роботі в лабораторії потрібно суворо дотримуватись правил техніки безпеки, розроблених для лабораторій такого типу, а також правил користування біоматеріалом, хімічними реактивами та барвниками. Студенти допускаються до занять лише після засвоєння цих правил та підпису про ознайомлення з ними в спеціальному лабораторному журналі. Особливо слід пам'ятати наступне:

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

2. До виконання лабораторних робіт студенти допускаються тільки за наявності захисного одягу – халату, маски, захисних окулярів, одноразових рукавичок.

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

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

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

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

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

8. У випадку порізу рану слід продезинфікувати.

9. Під час роботи з електроприладами потрібно суворо дотримуватись інструкції до приладу. Всі кабелі і проводи повинні бути ізольовані. Перед увімкненням приладу слід перевірити його технічний стан, у разі виявлення дефектів, спочатку потрібно їх усунути. Прилад під'єднується до електромережі (включається в розетку), а потім запускається відповідними перемикачами. Важливо, що відключення приладу має відбуватись у строго зворотньому порядку, спочатку виключається перемикач і тільки після цього він від'єднується від електромережі. Переносити чи ремонтувати обладнання, яке знаходиться під напругою, заборонено.

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

11. У приміщенні лабораторії слід суворо дотримуватись правил протипожежної безпеки. Категорично заборонено залишати увімкнені прилади без нагляду.

12. В лабораторії потрібно підтримувати чистоту. Не допускається обмеження проходів, виходів з лабораторії, підходів до протипожежного інвентаря.

13. Заборонено заносити в лабораторію будь-який одяг та їжу, а також захарашувати лабораторні столи посудом, ємностями з реактивами, піпетками, витратним матеріалом та іншим обладнанням.

14. При всіх нестандартних ситуаціях в лабораторії (розбиття посуду, пролиття реактивів чи вмісту пробірок) слід негайно доповісти викладачу.

15. По закінченні роботи всі електроприлади мають бути вимкнено, робоче місце прибрано, руки вимито з милом.

2. Ознайомитись з приладами та обладнанням молекулярно-генетичної лабораторії, принципами роботи з ними.

Розглянути будову **одноканальних піпеточних дозаторів** із різним діапазоном об'ємів – 1-10, 10-100, 100-1000 мкл (рис. 1.2). Оглянути основні частини дозатора (рукоятку, дисплей, механізм регулювання об'єму, кнопку натиску (механізм забору та викиду рідини), кнопку скидування наконечника). Звернути увагу на те, що дозатори з різним об'ємом марковані різним кольором, який співпадає з кольором змінного одноразового наконечника та коробки в якій вони знаходяться.



Рис. 1.2. Схема будови одноканального піпеточного дозатора у розібраному вигляді.

З допомогою автоматичних дозаторів і наконечників спробувати відібрати наступні об'єми дистильованої води: 1, 3, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 1000 мкл.

Ознайомитись з принципом роботи **центрифуги** та підготовки зразків до центрифугування. Звернути увагу на особливості та дотримання правил розташування пробірок у роторі (обов'язкове попарне, симетричне розташування пробірок, специфічна орієнтація кришечок. Спробувати встановити задані параметри центрифугування. Здійснити центрифугування підготовлених зразків у мікропробірках за заданими параметрами (час, частота обертів).

Ознайомитись з роботою **вортекса**, здійснити обробку зразків.

Ознайомитись з роботою **термошейкера**, здійснити обробку зразків за заданими параметрами (час, температура).

ЗАНЯТТЯ № 2

ТЕМА: Геномні дані та їх отримання, ресурси і геномні браузері, аналіз геномних послідовностей.

МЕТА: ознайомитись із геномними даними та різними методами їх отримання, вільно доступними геномними ресурсами та браузерами, а також отримати базові навички розуміння аналізу геномних послідовностей.

ОБЛАДНАННЯ:

- комп'ютери з доступом до Інтернету; веб-браузери (наприклад, Google Chrome, Mozilla Firefox); безкоштовні геномні бази даних та браузерів (NCBI, EMBL, UCSC Genome Browser).

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Спадковість, тобто здатність організмів забезпечувати матеріальну та функціональну наступність між поколіннями є фундаментальною ознакою живого. Одиниця спадковості – *ген*, що є частиною молекули ДНК, яка має певну послідовність нуклеотидів і є функціональною одиницею спадкової інформації. У прокаріотів переважна більшість генів, розташовані на одній хромосомі, що має вигляд кільцевої ДНК. У еукаріотів зазвичай кілька окремих лінійних спіралей ДНК упаковані в щільні комплекси ДНК-білок, що називаються хромосомами.

Повний набір генетичної інформації організму, закодованої в послідовностях нуклеотидів ДНК (чи РНК для деяких вірусів) або повна послідовність нуклеотидів ДНК гаплоїдного набору хромосом називається *геномом*. Геном включає як кодуючі ділянки (гени), так і не кодуючі. Повний геном плодової мушки дрозофіли містить 120 млн пар основ, геном риби фугу – 400 млн п.о., а геном людини – 3200 млн. п.о.

Екзом – це частина геному, де знаходяться кодуючі гени або ж сукупність екзонів, тобто всіх ділянок ДНК, які несуть інформацію. Екзом становить близько 1% всього геному людини (30 млн п.о.), що може експресуватися в протеїни та представлений приблизно 21 тисячею різних генів. Решта генетичного матеріалу виконує інші функції. Втім насправді генів не так мало, бо один ген може кодувати різні протеїни залежно від його прочитання.

Геноміка – розділ молекулярної генетики, який спеціалізується на вивченні повних геномів, включаючи повний набір генів, їх нуклеотидну послідовність та організацію, а також їх взаємодії всередині виду та з іншими видами.

Досягнення геноміки стали можливими завдяки технології секвенування ДНК. *Секвенування ДНК* – це набір методів, який передбачає встановлення точного порядку нуклеотидів у молекулі ДНК. Нуклеотиди, а саме аденін (А), гуанін (Г), цитозин (Ц) та тимін (Т), складають *генетичний код* (певну відповідність між послідовністю нуклеотидів у молекулі ДНК (мРНК) і послідовністю амінокислот у молекулах білків, які нею кодуються) і надають важливу інформацію про ознаки та характеристики організму. Поява методів швидкого секвенування ДНК зробила революцію в таких галузях, як біологія, медицина, біотехнологія, вірусологія, систематика і криміналістика.

У фундаментальних біологічних дослідженнях секвенування ДНК стало незамінним інструментом. Це дозволяє вченим розгадувати таємниці життя, вивчаючи генетичну інформацію, закодовану в ДНК. Воно відіграло ключову роль у таких проєктах, як ДНК-географічний проєкт, метою якого є відстеження історії міграції людей. Крім того, секвенування ДНК широко використовується в таких прикладних галузях, як медична діагностика, де допомагає ідентифікувати генетичні мутації, пов'язані з різними захворюваннями, включаючи різні види раку. Порівнюючи здорові та мутовані послідовності ДНК, медичні працівники можуть точно діагностувати захворювання та розробляти індивідуальні плани лікування для пацієнтів.

Отримання геномної інформації.

Геномні дані можна отримати за допомогою різних методів секвенування, в залежності від завдань та мети досліджень.

Секвенування ДНК (DNA Sequencing – DNA-Seq) – це набір біохімічних методів для встановлення послідовності нітратних (азотистих) основ молекули ДНК (рис. 2.1).

Секвенування РНК (RNA Sequencing – RNA-Seq) – це набір біохімічних методів для встановлення послідовності нітратних основ первинної структури молекул РНК (рис. 2.1). Метод застосовується для виявлення саме активних (експресованих) генів у клітині, які працюють і тому транскрибують РНК.

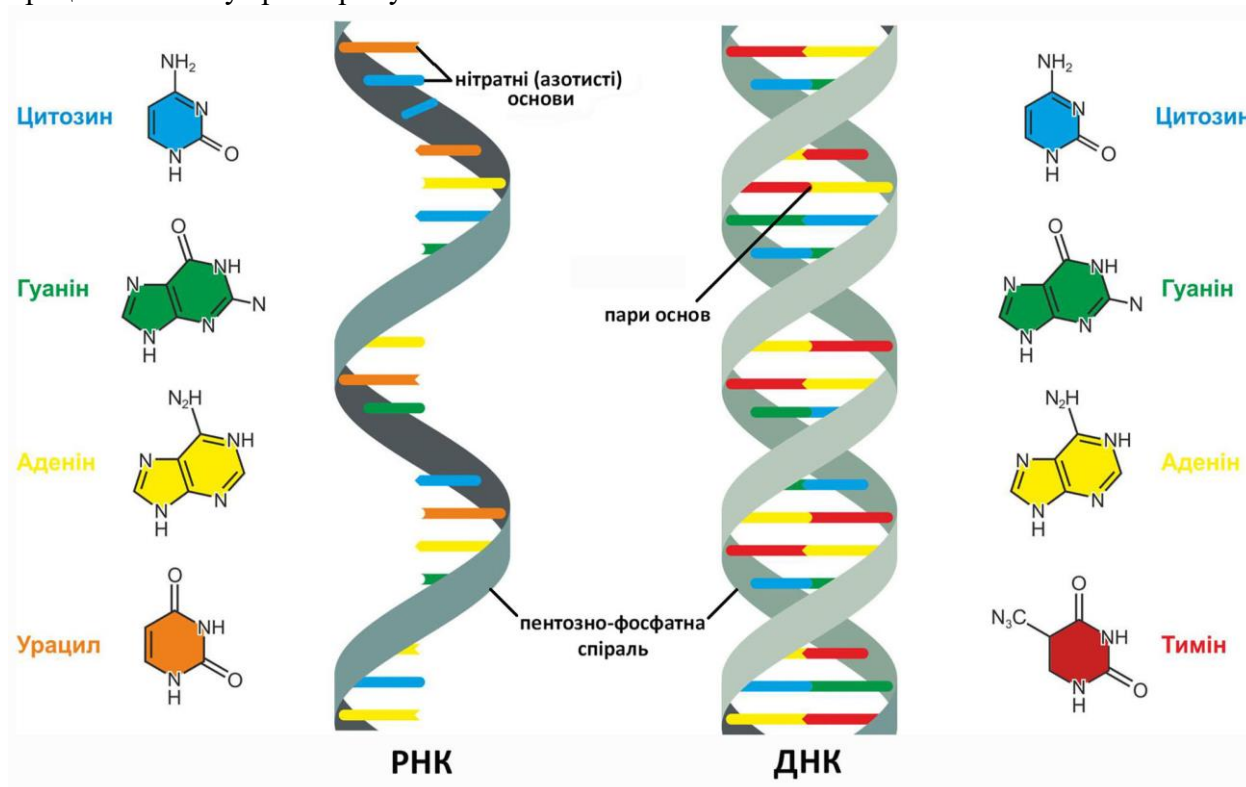


Рис. 2.1. Структура нуклеїнових кислот. Порівняння структури одноланцюгової РНК та дволанцюгової ДНК, а також азотистих основ, які входять до їх складу.

Повногеномне секвенування (Whole Genome Sequencing – WGS) – прочитання нуклеотидної послідовності, тобто розшифровка всього геному організму.

Повноекзомне секвенування (Whole Exome Sequencing – WES) відрізняється від WGS тим, що розшифровуються нуклеотидні послідовності лише тих ділянок ДНК, які містять гени, тобто безпосередньо кодують послідовність амінокислот у білках.

Існують ще два підходи до секвенування – епігеномне та метагеномне. Проте обидва не є суто генетичними, бо можуть бути визначені зовнішнім середовищем, таким як харчування, стрес, антибіотики тощо.

Епігеномне секвенування (Epigenetic Sequencing) – методологія для дослідження та аналізу хімічних модифікацій ДНК та білків, які з нею асоціюються. Зокрема, це може включати в себе вивчення таких феноменів як метиляція ДНК (модифікація молекули ДНК без зміни її нуклеотидної послідовності), модифікація хроматину та інші зміни, які не змінюють первинну послідовність нуклеотидів у ДНК, але можуть регулювати генну активність. Цей метод важливий для розуміння, як гени регульовані на рівні, що виходить за межі простого коду ДНК, та може мати практичне застосування в розумінні розвитку хвороб, таких як рак, або у розробці нових методів лікування.

Метагеномне секвенування (Metagenomic Sequencing) – метод дослідження таксономної різноманітності мікробіоценозів, коли секвенують геноми всіх мікроорганізмів з однієї проби, а видове чи штамове різноманіття визначають за допомогою порівняння отриманих послідовностей з подібними послідовностями в геномних браузерях. Цей метод дозволяє оперативно встановити різноманіття мікроорганізмів у досліджуваних пробах та може бути ефективно застосований для дослідження мікробіомів у екології, медицині, агрономії тощо.

Таким чином, *метагеноміка* передбачає секвенування збірних геномів мікроорганізмів у зразках, що дозволяє вивчати мікробіоми без необхідності індивідуального культивування.

Геномні ресурси.

Велика кількість геномних даних вимагає спеціалізованих баз даних та інструментів для їхнього зберігання, пошуку і аналізу. З цією метою розроблено кілька публічних геномних ресурсів і програмних засобів (браузерів), які дозволяють візуалізувати, аналізувати та проводити пошук інформації по доступним в інтернеті геномним базам даних. Основними ресурсами є:

1. Національний центр біотехнологічної інформації США (NCBI) – важливий ресурс для геномних даних. У *NCBI* є численні бази даних, зокрема *GenBank* – відкрита база даних нуклеотидних послідовностей. *NCBI* надає детальну інформацію про всі типи даних, які можна знайти через їх веб-платформу (рис. 2.2). Посилання: [Головна сторінка NCBI](#) та [Довідник NCBI](#).

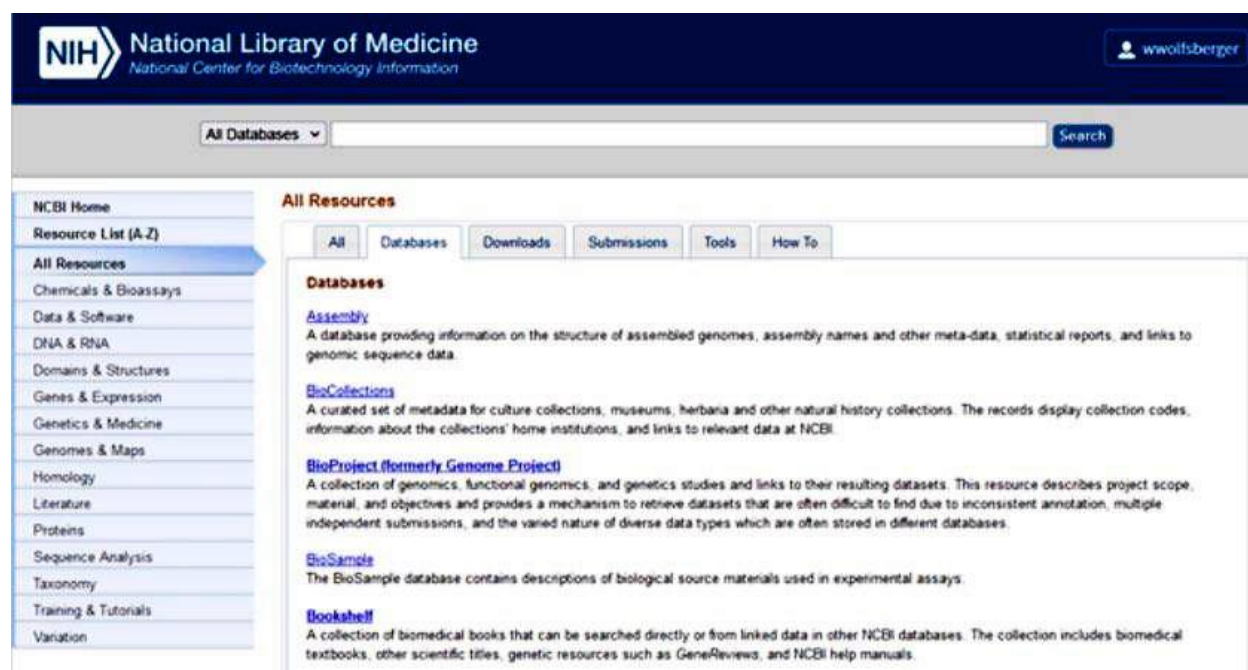


Рис. 2.2. Загальний вигляд інтерфейсу *NCBI*.

2. **Європейська лабораторія молекулярної біології (EMBL)** – європейський аналог *NCBI*, який містить широкий спектр геномних даних та засобів біоінформатики. Посилання: Головна сторінка EMBL.

Геномні браузер – інтерактивні платформи, які дають можливість користувачам візуалізувати та досліджувати геномні дані. Вони надають графічне представлення послідовностей геному та пов'язаних з ними анотацій. Найбільш відомими браузерами є:

1. **UCSC Genome Browser** – розроблений Університетом Каліфорнії в Санта-Крузі, що надає можливість детального перегляду послідовностей геному разом із широким спектром анотацій, таких як прогнозування генних частот, вирівнювання мРНК і білкових доменів (рис. 2.3). Посилання: *UCSC Genome Browser*.

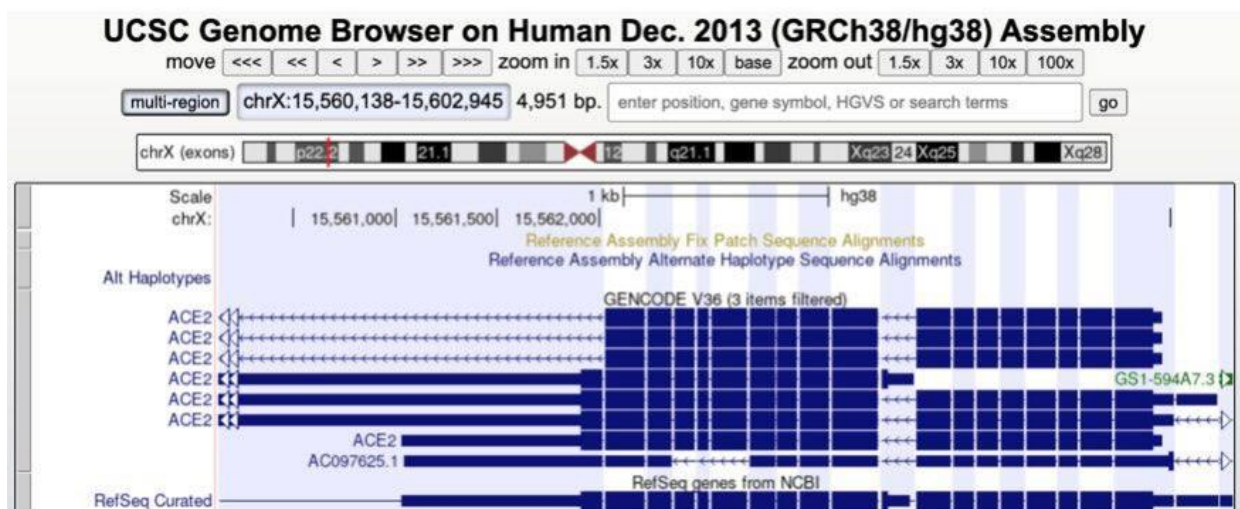


Рис. 2.3. Інтерфейс браузеру *UCSC*. Розгляд ділянки X-хромосоми та рядки анотації щодо цієї ділянки.

2. **Ensembl** – розроблений за підтримки *EMBL* – надає анотації для широкого діапазону геномів хребтних тварин. Це комплексний ресурс геномних даних і анотацій. Посилання: *ENSEMBL*.

3. **Integrative Genomics Viewer (IGV)** – високопродуктивний інструмент візуалізації для інтерактивного дослідження великих наборів даних. *IGV* надає можливість користувачам візуалізувати геномні дані в різних масштабах. Посилання: *IGV*.

Поширені формати геномних даних.

У галузі геноміки дані часто зберігаються та обмінюються в стандартних форматах файлів, кожен з яких призначений для представлення різних типів інформації. Розуміння цих форматів файлів має вирішальне значення для будь-кого, хто працює в зазначеній галузі, оскільки вони визначають, як дані обробляються, аналізуються та інтерпретуються. Найпоширенішими форматами файлів у геноміці є *FASTA*, *FASTQ* і *VCF*.

1. **Формат FASTA** використовується для представлення нуклеотидних послідовностей (ДНК/РНК) або амінокислотних послідовностей (білків). Він починається з однорядкового опису, за яким розміщуються послідовності нуклеотидів або амінокислот. Кожна окрема послідовність ДНК (рядок) починається символом ">" (рис. 2.4).

Файли *FASTA* можуть походити з необроблених (сирих) даних, із публічних ресурсів або з будь-якого джерела, де потрібне представлення послідовності, без потреби в оцінках якості чи додаткових коментарях (метаданих).

Файли *FASTA* звичайно використовуються в інструментах вирівнювання послідовностей, всередині ресурсів (баз даних), таких як *GenBank NCBI*, і для створення наборів (бібліотек) споріднених послідовностей, або для еталонних геномів.

```

Шапка —●>VIT_201s0011g03530.1
Послідовність —●AATTAAAGCATAAATACSTCACTCTTACCCSCTGATTTTCTTATCTCTCATCACSTTTGGTGCGAAG
●GACCATGAGAAACAAGCTGCAATGGGTGTAGGGTCTCTCGCAAGGCATGCAGCCAAAGACTGCATCA
Шапка —●>VIT_201s0011g03540.1
Послідовність —●CAGGTAGCGTGAAGTTAAACCCCTAGGGCTTTAGACAAACAGCTGTAGTCAACCCSACAAACACC
●AGCCTCTGAGACACCACCTCAAAACCTTTCCACTTAAATACACATCCCTCACAACCTTTTCAATTC
Шапка —●>VIT_201s0011g03550.1
Послідовність —●CATGCAAAAGCTGAACCGGATGCTGTGATTTGGTGGTAAGTGGTAGTTGAGTAAATTTGACAGTGAA
●CCCGAAATGGTAAAGACTAAGGCTAGAAGTAGAATACCACTGTTCTTCTCATCACGTTGGCCCA
    
```

Рис. 2.4. Приклад файлу у форматі *FASTA*.

2. Формат *FASTQ* представляє послідовності нуклеотидів разом із відповідними оцінками якості (рис. 2.5). Кожен запис у файлі *FASTQ* складається з чотирьох рядків:

- 1) ідентифікатора послідовності (назви);
- 2) самої послідовності ДНК;
- 3) рядка-роздільника (зазвичай «+»);
- 4) рядка значень якості визначення кожної основи (метаданих) у послідовності.

Файли *FASTQ* зазвичай генеруються високопродуктивними секвенаторами (такими як *Illumina*), на виході з початкового процесу секвенування.

Файли *FASTQ* є відправною точкою для більшості аналізів геномних даних, включаючи вирівнювання послідовностей, контролю якості та визначення варіантів (мутацій) всередині послідовності.

```

Шапка —●@SRR566546.970 HWUSI-EAS1673_11067_FC7070M:4:1:2299:1109 length=50
Послідовність —●TTGCCTGCCTATCATTTTAGTGCCTGTGAGGTGGAGATGTGAGGATCAGT
Знак + —●+
Якість —●hhhhhhhhhhghhghhhhhfhhhhfffffe'ee['X]b[d[ed'[Y[~Y
Шапка —●@SRR566546.971 HWUSI-EAS1673_11067_FC7070M:4:1:2374:1108 length=50
Послідовність —●GATTTGTATGAAAGTATACAACATAAACTGCAGGTGGATCAGAGTAAGTC
Знак + —●+
Якість —●hhhhgfhhcghghggfcaffdhfehhhhcehdchhdhahehffffde'bVd
    
```

Рис. 2.5. Приклад файлу формату *FASTQ*.

3. Формат виклику варіантів (*VCF*) використовується для зберігання варіантів мінливості (мутацій) у послідовності ДНК. Файл *VCF* містить рядки метаінформації (метаданих), рядок заголовка (шапка) та рядки даних (записи), кожен з яких містить інформацію про позицію в геномі (рис. 2.6).

Файли *VCF* генеруються інструментами виклику варіантів, які ідентифікують варіанти (мінливості ДНК) шляхом порівняння вирівняних даних послідовності (з файлів *BAM*) із еталонним геномом.

Файли *VCF* є важливими в геноміці для демонстрації генетичних варіацій. Вони використовуються в дослідженнях популяційної генетики, різних видів хвороб та еволюційній біології.

Шапка	VCF												
	<pre>##fileformat=VCFv4.2 ##contig=<ID=2,length=51304566> ##INFO=<ID=AC,Number=A,Type=Integer,Description="Allele count in genotypes"> ##INFO=<ID=AN,Number=1,Type=Integer,Description="Total number of alleles in called genotypes"> ##FORMAT=<ID=GT,Number=1,Type=String,Description="Genotype"> ##FORMAT=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Read Depth"> ##FORMAT=<ID=GQ,Number=1,Type=Integer,Description="Genotype Quality"> #CHROM POS ID REF ALT QUAL FILTER INFO FORMAT SAMPLE1 SAMPLE2 SAMPLE3 SAMPLE4 SAMPLE5 SAMPLE6 SAMPLE7 2 81170 . C T . . AC=9;AN=7424 GT:DP:GQ 0/0:4:12 0/0:3:9 0/1:1:3 0/1:9:24 1/0:4:12 0/0:5:15 0/0:4:12 2 81171 . G A . . AC=6;AN=7446 GT:DP:GQ 0/1:4:12 0/0:3:9 0/0:1:3 0/0:9:24 0/1:4:12 0/1:5:15 0/0:4:12 2 81182 . A G . . AC=5;AN=7506 GT:DP:GQ 0/0:5:15 0/0:4:12 0/0:5:15 0/0:9:24 0/0:4:12 0/0:4:12 0/0:4:12 2 81204 . T G . . AC=2;AN=7542 GT:DP:GQ 1/0:5:15 0/0:9:27 0/0:10:30 0/0:15:39 0/0:9:27 1/0:13:39 0/1:14:42</pre>												
Записи	<p>Хромосома\позиція\мутація Присутність мутацій/додаткові дані</p>												

Рис. 2.6. Приклад файлу формату VCF.

Різні формати файлів є основою для представлення та аналізу геномних даних. Кожен формат було створено для певного типу даних і аналізу, тому їх розуміння критично важливе для всіх, хто зацікавлений у геноміці. Коли йдеться про необроблені дані послідовностей, вирівняні риди чи ідентифіковані варіанти, ці формати забезпечують стандартизацію, доступність для інтерпретації та можливість для подальшого аналізу геномних даних.

Геноміка має значне практичне застосування. Різні типи доступних геномних даних надають комплексний огляд генетичної структури організмів – від ізольованих генів до повних геномів. Доступні ресурси та браузерери є незамінними інструментами для дослідників, допомагаючи їм збирати, візуалізувати та зберігати важливу інформацію. В процесі того як геноміка продовжує розвиватися, ці інструменти та ресурси будуть відігравати щоразу більшу і ключову роль у розумінні життєвих процесів на молекулярному рівні.

ХІД РОБОТИ:

1. Дослідження геномних баз даних:

- Перейдіть на домашню сторінку *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);
- Скористайтеся панеллю пошуку, щоб знайти потрібний ген, наприклад, «*BRCA1*»;
- Ознайомтесь із розділом «Геноми», щоб зрозуміти різноманітність доступних геномних даних, від бактерій до людей;
- Виберіть певний організм, наприклад, «*Homo sapiens* L.» і перегляньте його геномні дані, включаючи хромосоми, мітохондріальну ДНК і плазмиди, якщо це можливо.

2. Використання геномних браузерів:

- Перейдіть до *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>);
- Виберіть геном «*Human*» та його найновішу версію;
- Використовуйте рядок пошуку, щоб перейти до гену *TNF*;
- Ознайомтесь із інтерфейсом, досліджуючи доріжки, як анотації генів, область кодування білка та регуляторні елементи;
- Використовуйте функції «збільшення» та «зменшення», щоб переглянути деталі з різною роздільною здатністю, від окремих нуклеотидів до цілих хромосом.

3. Базовий аналіз геномних послідовностей.

Отримання послідовностей ДНК:

- Перейдіть до бази даних нуклеотидів *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>);
- Знайдіть ген «*TP53 human*»;
- Скачайте послідовність ДНК у форматі *FASTA*;
- Відкрийте *FASTA* файл у блокноті та ознайомтесь з його вмістом.

4. Ідентифікація відкритих рамок зчитування (*ORF*).

Відкрита рамка зчитування або *ORF* (від англ. *open reading frame*) – фрагмент геному організмів, який містить нуклеотидну послідовність, що потенційно могла б транслюватися в білок. Початок і кінець *ORF* не еквівалентні до кінців мРНК, але вони зазвичай містяться в межах мРНК. У гені, *ORF* розміщуються між кодом початку трансляції (старт-кодоном) і термінальним кодоном (стоп-кодоном).

- Використовуйте завантажену послідовність ДНК як вхідні дані для *ORFfinder* від *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>);
- Досліджуйте прогнозовані *ORF*, відзначаючи їх положення, довжину та відповідні білкові продукти.

5. Порівняльна геноміка:

- Отримайте геномні послідовності певного гена з двох різних організмів, наприклад, «*Insulin in humans*» та «*Insulin in mice*»;
 - Збережіть послідовності у форматі *FASTA* для подальшого аналізу.
- Вирівнювання послідовності за допомогою *BLAST*:
- Перейдіть до інструменту *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) на *NCBI*;
 - Використовуйте програму "*blastn*", щоб порівняти дві геномні послідовності;
 - Проаналізуйте результати вирівнювання, зосереджуючись на ідентичності послідовності, пропусках та еволюційних наслідках;
 - Дослідіть значення збережених регіонів.

ЗАНЯТТЯ № 3

ТЕМА: Механізми формування і поширення геномного різноманіття. Знаходження та анотація варіацій у малих геномах.

МЕТА: ознайомитись із фундаментальними поняттями геномного різноманіття, його формуванням та поширенням. Навчитись ідентифікувати та анотувати варіації в малих геномах за допомогою безкоштовних веб-баз даних і програмного забезпечення.

ОБЛАДНАННЯ:

- комп'ютери з доступом до Інтернету; веб-браузери (наприклад, Google Chrome, Mozilla Firefox); безкоштовні геномні бази даних (наприклад, *NCBI*, *EMBL-EBI*); базове програмне забезпечення для роботи з електронними таблицями (наприклад, Microsoft Excel або Google Sheets).

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Геномне різноманіття є ключовим аспектом у генетичних та еволюційних дослідженнях. Воно відображає наявність різних генетичних варіантів або алелей у межах популяції, виду або надвидових таксонах. Вивчення геномного різноманіття має ряд важливих практичних застосувань:

- знання геномної структури популяції (гомо- чи гетерогенна) є важливою передумовою формування охорони і збереження видів, які знаходяться під загрозою зникнення;
- відомості про геномне різноманіття в популяціях людей може сигналізувати про схильність до певних захворювань та впливати на коригування курсів лікування;
- у сільському господарстві, вивчення геномного різноманіття може допомогти у підборі селекційного матеріалу тварин і рослин з бажаними характеристиками;
- геномне різноманіття може вказувати на тренди та швидкість еволюційних процесів у різних групах організмів.

Еволюційні механізми такі як *мутації*, *потік генів (міграція)*, *генетичний дрейф*, *природний добір* та *невипадкове спарювання* відіграють ключову роль у формуванні

геномного різноманіття. Розуміння цих механізмів є фундаментальним для глибокого вивчення еволюції, адаптації та функціональної ролі генів у організмі.

Мутація – це зміна в інформації геному – послідовності нуклеотидів у молекулі ДНК, зміни в будові хромосом або зміни в цілих геномах. Мутації бувають різних типів: домінантні та рецесивні. Якщо мутація домінантна, то для її вираження досить аби інформацію мала одна з двох хромосом. Якщо мутація рецесивна, то для її вираження потрібно, щоб обидві хромосоми мали одну і ту саму мутацію.

Причинами мутацій можуть бути наступні фактори:

- *помилки реплікації* – виникають у процесі реплікації ДНК. Наприклад, поява або зникнення одного з нуклеотидів внаслідок помилки роботи ДНК-полімерази, що може викликати невідповідність у новосинтезованій нитці ДНК материнській;

- *зовнішні чинники* – такі мутагенні фактори, як радіація (УФ-промені сонця) або хімічні речовини, що можуть викликати зміни в послідовності ДНК. Це призводить до розривів ланцюгів ДНК або викликає аномальний зв'язок між нуклеотидними основами;

- *транспоновані генетичні елементи (транспозони)* – це короткі послідовності ДНК, які здатні до зміни положення в геномі, цим самим змінюючи послідовність нуклеотидів у ДНК, що може викликати мутаційні зміни.

Мутації часто сприймаються негативно. З одного боку, вони можуть призводити до виникнення патологій і захворювань, зокрема генетичних розладів, раку та інших станів. З іншого боку, мутації є важливим матеріалом для еволюційного процесу та основою генетичної різноманітності. Мутації можуть бути:

- *корисними* – деякі мутації можуть надавати організмам перевагу в певних умовах, що веде до збільшення їхньої представленості в популяції через природний добір;

- *нейтральними* – більшість мутацій нейтральні і не впливають на фенотип організму. Ці мутації можуть стати значущими пізніше, якщо умови середовища зміняться;

- *шкідливими* – деякі мутації можуть бути шкідливими чи навіть летальними для організму. Такі мутації часто виводяться з популяції через природний добір, хоча іноді вони можуть бути збережені в популяції, якщо їх негативний ефект проявляється пізніше, після репродуктивного віку.

Міграція (потік генів) – описує передачу генетичних варіантів від однієї популяції до іншої. Генетичний матеріал переноситься між популяціями через репродуктивні зв'язки або міграцію особин. Перенесення може відбуватися різними способами, включаючи спарювання між особинами з різних популяцій або переміщення особин з одного місця проживання до іншого. Потік генів відіграє важливу роль у підтримці генетичного різноманіття всередині популяцій. Він допомагає запобігти надмірній генетичній ізоляції популяцій, що може призвести до видоутворення. Однак з іншого боку, надмірний потік генів може зменшити унікальні генетичні характеристики популяції, призводячи до можливої втрати адаптацій, які є корисними в конкретних екологічних умовах.

Дрейф генів (генетичний дрейф) – це випадковий процес, який впливає на частоту алелей (різних форм гена) в популяції протягом часу. Він відрізняється від природного добору, який сприяє алелям, надаючи організмам переваги виживання. Генетичний дрейф не робить відмінності між корисними, нейтральними чи шкідливими алелями. Два основні явища сприяють генетичному дрейфу:

- *ефект пляшкового горла (вузького місця)* відбувається, коли популяція різко зменшується внаслідок таких подій як стихійні лиха. Особини, які вижили, можуть не відображати весь генетичний склад первинної популяції, що призводить до втрати генетичного різноманіття;

- *ефект засновника* відбувається, коли невелика група особин колонізує нове середовище, вони можуть нести лише частину генетичного різноманіття, який був характерний для їхньої батьківської популяції. Це може призвести до зміни генетичного складу новоутвореної популяції, яка відрізняється від популяції-предка.

Обидва явища можуть суттєво вплинути на генетичне різноманіття і можуть мати довготривалі наслідки для еволюційного розвитку популяцій.

Природний добір – еволюційний механізм, завдяки якому організми, краще пристосовані до свого середовища, мають більші шанси для виживання і забезпечення нащадків.

Існує три ключові типи природного добору:

- *рушійний добір* надає перевагу крайнім варіантам певної ознаки на відміну від середніх показників. Зокрема, якщо більший розмір особини є перевагою в конкретному середовищі, то з часом ця ознака у популяції буде зміщуватися на користь більших особин;

- *стабілізуючий добір* надає перевагу особинам з проміжними фенотипами, зменшуючи частоту відхилень від середнього. Один із прикладів – вага новонароджених дітей, де і надмірно низька, і надмірно висока вага може бути небезпечною;

- *дизруптивний добір* надає перевагу обом крайнім фенотипам на відміну від проміжних. Це може спричинити поділ популяції на дві різні підгрупи.

Природний добір, у комбінації з мутаціями, сприяє еволюційному розвитку видів. З часом корисні мутації накопичуються, а шкідливі алелі ефективно відсіюються, сприяючи адаптації організмів до змін у навколишньому середовищі.

Геномне різноманіття (геномна варіативність) – міра різноманіття генетичного матеріалу в популяції або виді. Вона включає в себе всі форми генетичних відмінностей, включаючи мутації, поліморфізми, вставки, делеції (хромосомні перебудови, за яких відбувається втрата ділянки хромосоми) та інші види генетичних змін. Геномна варіабельність є важливим чинником, що визначає здатність популяції адаптуватися до змін умов оточуючого середовища та відіграє ключову роль у процесах еволюції. Вона є результатом взаємодії різноманітних генетичних факторів, які діють упродовж тривалого часу. Це різноманіття дає нам зріз еволюційної історії популяцій та видів, відображаючи минулі події, адаптації та стратегії виживання. Розуміння механізмів, які керують геномним різноманіттям, має не лише теоретичний, але й практичний інтерес у сферах, що варіюються від природоохоронної біології до медицини.

Досліджуючи геномне різноманіття, вчені можуть простежувати еволюційну історію організмів, ідентифікувати популяції, які знаходяться під загрозою зникнення, і навіть відстежувати поширення хвороб.

ХІД РОБОТИ:

Отримання геномних даних:

- Перейдіть на веб-сайт *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);
- Використовуйте рядок пошуку, щоб знайти фрагмент мітохондріального ДНК Африканського слона (*Loxodonta africana*);
- Завантажте послідовність геному у форматі *FASTA*, текстовому форматі для представлення нуклеотидних послідовностей.

Виявлення варіацій.

Після отримання послідовності геному наступним кроком є ідентифікація варіацій або варіантів. Варіантами можуть бути одонуклеотидні поліморфізми (*SNP*), вставки, делеції або навіть більші структурні варіації.

BLAST (базовий інструмент пошуку локального вирівнювання) – інструмент, що дозволяє шукати гомологічні (ті, які походять від спільного предка) послідовності у базі даних *NCBI* (рис. 3.1).

- Перейдіть до інструменту *BLAST* на веб-сайті *NCBI*;
- Введіть завантажену послідовність геному;
- Виконайте *BLAST* і дочекайтеся результатів;
- Дослідіть результати запуску;

- Виберіть три найкращі результати (найвищі у списку) і три найгірші (в кінці) та порівняйте наскільки вони відповідні. Використайте графічний інструмент *BLAST*, щоб побачити місця відмінності серед послідовностями.

Після відображення результатів студенти повинні занотувати будь-які варіації чи відмінності, які спостерігаються між геномами. Ці варіації можуть бути у формі замін або інсерцій (вставок)/делецій (випадіння) одного або кількох нуклеотидів.

Опис	Наукова назва	Max Score	Total Score	Query Cover	Відсоток співпадіння			Accession
					E value	Per. Ident	Acc. Len	
<input type="checkbox"/> Loxodonta africana clone Loxodonta africana type 3_Mu cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Loxodonta africana	664	664	100%	0.0	100.00%	359	MN148747.1
<input type="checkbox"/> Loxodonta africana isolate SW0207 NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) gene, partial cds, NADH dehydrogenase	Loxodonta africana	658	658	100%	0.0	99.72%	4257	JQ438674.1
<input type="checkbox"/> Loxodonta africana isolate HG2179 NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) gene, partial cds, NADH dehydrogenase	Loxodonta africana	658	658	100%	0.0	99.72%	4257	JQ438605.1
<input type="checkbox"/> Loxodonta africana isolate KR0014 NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) gene, partial cds, NADH dehydrogenase	Loxodonta africana	658	658	100%	0.0	99.72%	4257	JQ438459.1
<input type="checkbox"/> Loxodonta africana isolate KR0012 NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) gene, partial cds, NADH dehydrogenase	Loxodonta africana	658	658	100%	0.0	99.72%	4257	JQ438457.1

Рис. 3.1. Результати пошуку *BLAST*. E-статистика відображає ймовірність, що послідовності співпадають випадково, відсоток співпадіння відображає наскільки знайдена послідовність співпадає з шуканою.

Анотація геномних варіантів.

Після ідентифікації варіацій потрібно зрозуміти їх значення. Варіації можуть бути нейтральними та не вносити ніяких змін до білків, або змінювати/впливати на їх функцію та структуру.

Для оцінки та передбачення ефекту варіантів ми використаємо *VEP EMBL-EBI*. Цей інструмент передбачає вплив варіацій на гени, транскрипти та білкові послідовності.

- Перейдіть до web інструменту *VEP EMBL-EBI*. (https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP);

- Виберіть варіанти-приклад у форматі *VCF*, ознайомтесь з прикладами або вкажіть декілька відомих варіантів у форматі *rs** (використайте базу <https://www.snpedia.com/>);

- Виконайте аналіз.

Після відображення результатів задокументуйте потенційні наслідки кожного варіанту. Інструмент надає інформацію про тип варіантів, а також містить детальну інформацію про потенційний вплив мутації на функцію або структуру білка.

Аналіз даних та узагальнення.

Використовуючи наданий список варіантів проаналізуйте та узагальніть дані:

- Проаналізуйте список варіантів у формат *VCF* використовуючи *VEP*;
- Зберіть усі ідентифіковані варіації та їхні анотації;
- Класифікуйте варіації на основі їх потенційного впливу, наприклад, доброякісні, ймовірно доброякісні, невизначене значення, ймовірно патогенні або патогенні;

- Створіть візуальне представлення даних. Візуалізуйте кількість мутацій за їх типами та потенційною функцією у вигляді стовпчикових діаграм.

Підготуйте звіт про наслідки визначених варіацій. Чи пов'язані вони з якимись відомими захворюваннями чи станами? Чи дають вони якусь еволюційну перевагу?

ЗАНЯТТЯ № 4

ТЕМА: Виділення (екстракція) ДНК.

МЕТА: засвоїти методику виділення геномної ДНК з цільної крові людини на спін-колонках.

ОБЛАДНАННЯ:

- мікроцентрифуга на 12 000 об/хв, термошейкер, вортекс, морозильна камера (-80°C);
- мікропробірки типу епендорф (об'ємом 1,5-2 мл), штативи для пробірок, дозатори змінного об'єму та змінні наконечники з фільтрами до них, спін-колонки з фільтром-мембраною, пробірки для збору без кришечки (об'ємом 2.0 мл);
- халат, рукавички, захисні окуляри, маска.

МАТЕРІАЛИ І РЕАГЕНТИ: RNase A, Proteinase K, лізуючий буфер (Blood Lysis Buffer), зв'язуючий буфер (Binding Buffer), промиваючий буфер (Wash Buffer), вимиваючий буфер (Elution Buffer), 96% етанол.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Більшість наукових досліджень у галузі геномної біології на тій чи іншій стадії включають етап виділення нуклеїнових кислот (НК). За наявності виділеної ДНК, далі стають можливими її ампліфікація (збільшення кількості певних фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР), визначення послідовності нуклеотидів (секвенування), рестрикційний аналіз та інше. Технології виділення ДНК розрізняються не тільки за принципом дії, але й від типу біоматеріалу та подальшого застосування екстракту.

Вперше нуклеїнові кислоти намагалися виділити в середині XIX століття, коли ще практично нічого не було відомо про ці молекули. Однак з моменту відкриття структури та властивостей ДНК технології її виділення безперервно модифікуються та вдосконалюються.

Процедура виділення ДНК із клітин та тканин часто є вихідним (основним) етапом у дослідженні живого організму на молекулярному рівні. Щоб виділити ДНК живу клітину потрібно зруйнувати тим чи іншим способом, а саму молекулу компактизовану білками в хромосомах очистити від цих білків та інших клітинних компонентів. Тому насамперед, потрібно відокремити ДНК від білків, що входять до складу нуклеопротейдних комплексів хроматину. При цьому важливо максимально зберегти цілісність ДНК та захистити її від дії нуклеаз, оскільки довгі лінійні молекули ДНК при їх ізоляції із клітини неминуче під впливом цих ферментів фрагментуються. Таким чином, для виділення нуклеїнових кислот з біологічних матеріалів необхідно провести: лізис клітин (за допомогою механічних, ферментних або хімічних агентів), ферментативне руйнування білків протеїназами та/або депротейнізацію клітинного лізату (в т.ч. нуклеаз), відділення та очищення нуклеїнових кислот від клітинної маси.

На сьогодні використовують ряд методик для екстракції нуклеїнових кислот: *виділення фенол-хлороформом; виділення на спін-колонках; виділення на магнітних частинках; розумне виділення (Smart Extraction); ферментативне температурно-залежне виділення.*

Виділення фенол-хлороформом. Суть методики полягає в змішуванні клітинного лізату з фенолом, хлороформом і ізоаміловим спиртом у пропорції 25:24:1 і наступному перемішуванні та центрифугуванні суміші. Після проведення цих маніпуляцій розчин містить дві фази: водну та органічну, причому всі ліпіди та жири знаходяться в органічній (нижній) фазі, білки – на межі фаз, а нуклеїнові кислоти – у водній (верхній) фазі. Для підвищення чистоти екстракту ці дії повторюють кілька разів. Якщо розчин матиме низький рН, то ДНК перейде в органічну фазу, а РНК залишиться у водній фазі, що дозволяє виділяти РНК окремо від ДНК (рис. 4.1).

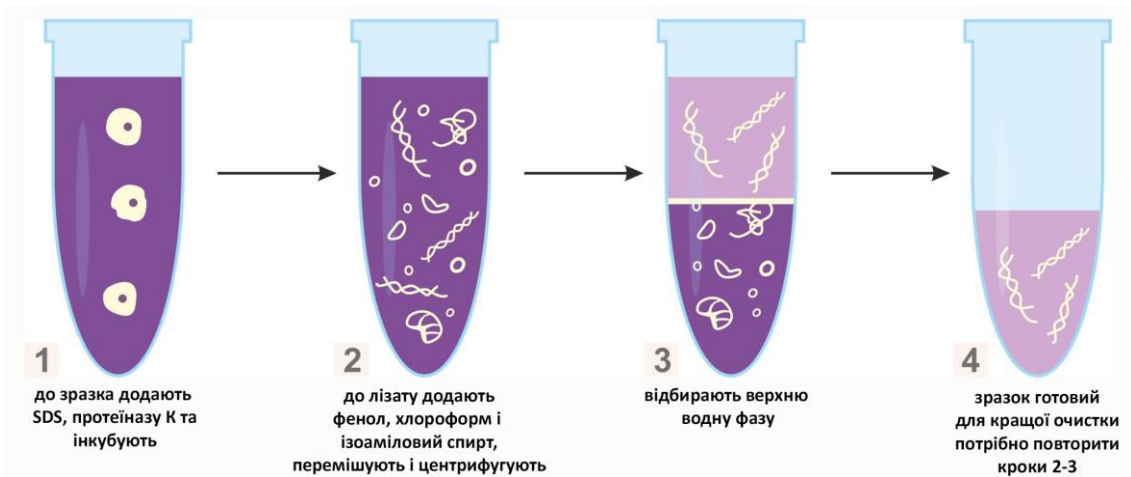


Рис. 4.1. Схема протоколу виділення фенол-хлороформом.

Виділення на спіні-колонках. Суть методу полягає в тому, що в лужних умовах та підвищених концентраціях солі ДНК зв'язується на спіні-колонках з сорбентом на основі діоксиду кремнію (SiO_2) без використання фенолу/хлороформу. Це дозволяє відокремити інші компоненти клітини від зв'язаної з діоксидом кремнію ДНК. Спіні-колонки сконструйовані так, що при нанесенні клітинного лізату на колонку та подальшому центрифугуванні ДНК залишається на колонці, а все зайве проходить крізь неї. Потім ДНК промивають кілька разів та проводять елюцію (вимивання) у пробірку для збору зразка. Під елюцією розуміють від'єднання зразків ДНК від діоксиду кремнію на спіні-колонках (рис. 4.2).

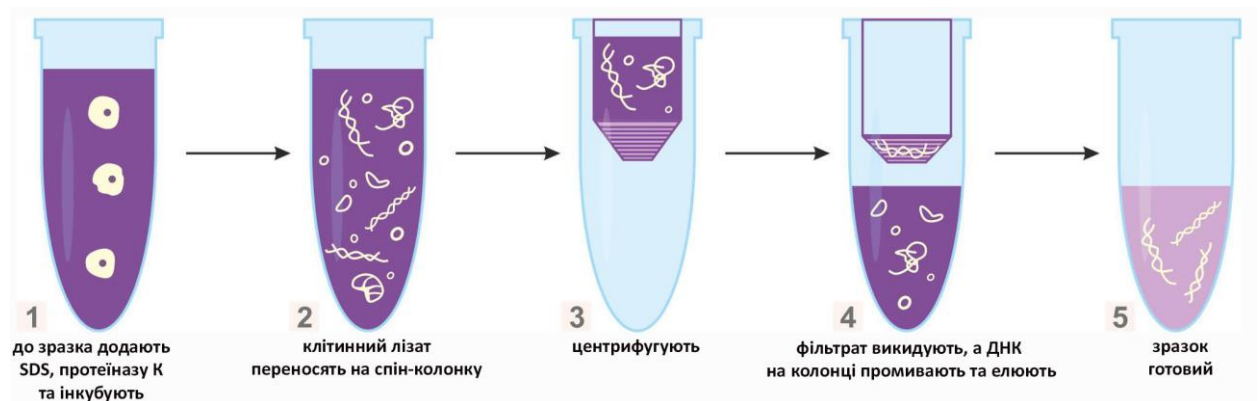


Рис. 4.2. Схема протоколу виділення на спіні-колонках.

Виділення на магнітних частинках. Метод полягає у зв'язуванні НК з речовиною, що вкриває магнітні частинки (целюлоза, сефадекс, сефакрил, dT-олігонуклеотиди, специфічні олігонуклеотиди та ін.). До клітинного лізату додають такі магнітні частинки та перемішують для зв'язування ДНК з ними. Після цього пробірку ставлять у магнітний штатив або підносять до магніту, фіксуючи таким чином тверду фазу. Після відбору супернатанту НК на частинках промивають та елюють (від'єднують від магнітних частинок) (рис. 4.3).

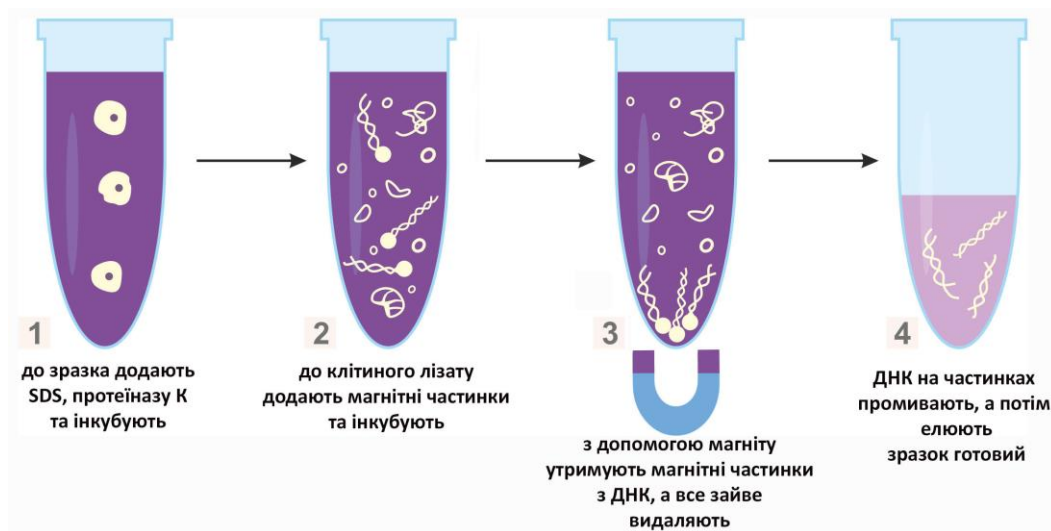


Рис. 4.3. Схема протоколу виділення на магнітних частинках.

Розумне виділення (англ. smart extraction). Для зв'язування НК із неорганічною твердою фазою можна використовувати не тільки хаотропні солі, але й суміш із хаотропних та нехаотропних солей з низькою іонною силою (технологія Dual Chemistry). Цю технологію вдосконалили з допомогою немагнітних частинок із «розумною» поверхнею. Для виділення НК використовують спеціальні наконечники з цими частинками, які надягають на дозатор. При заборі клітинного лізату в наконечник НК з розчину зв'язується з частинками, потім здійснюють етапи промивки та елюції, в результаті чого виходить очищена НК високої якості (рис. 4.4).

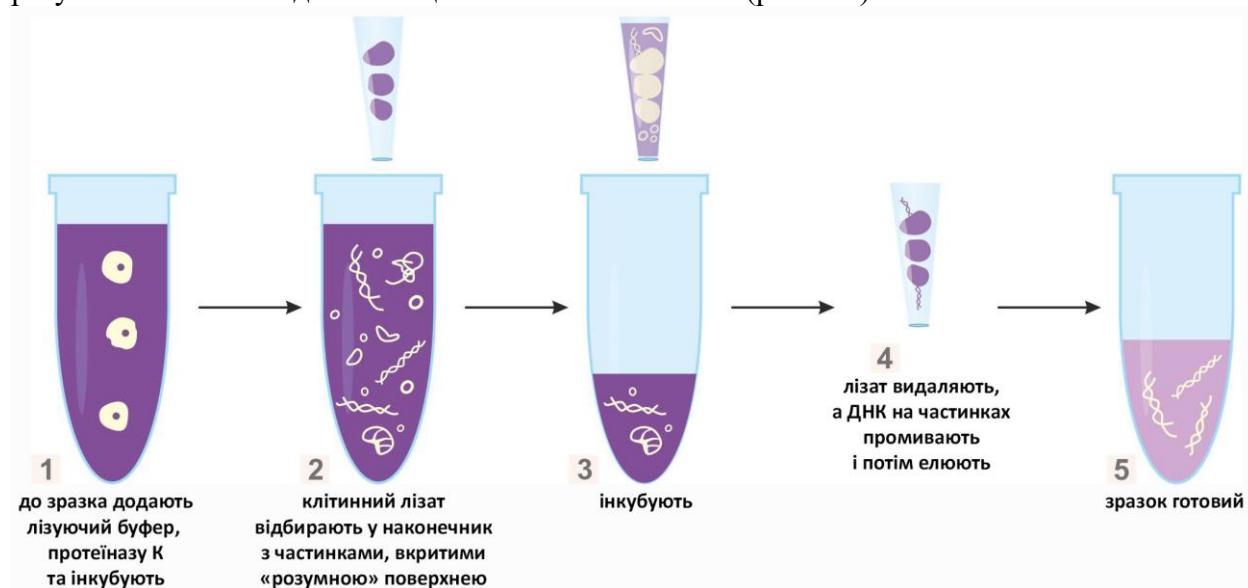


Рис. 4.4. Схема протоколу розумного виділення.

Всі вище перераховані методики мають загальну лімітуючу стадію – *етап лізису*. В усіх технологіях використовується SDS і протеїназа K для руйнування клітинних оболонок та вивільнення нуклеїнових кислот. SDS є інгібітором ПЛР, саме тому потрібні множинні стадії промивання, які підвищують ризик контамінації (забруднення домішками) та призводять до втрат зразка. Також складніші для лізису зразки можуть вимагати додаткову тривалу і трудомістку пробопідготовку.

У результаті досліджень проблеми, пов'язані з тривалим та складним лізисом, а також із використанням шкідливих хімікатів, були ліквідовані завдяки застосуванню дуже

ефективної термофільної (стійкої до високих температур) протеїнази EA1 разом з мезофільними гідролазами.

Ферментативне температурно-залежне виділення. Процес цього виділення нуклеїнових кислот починається зі змішування буфера та ферментів зі зразком. При подальшій інкубації за кімнатної температури гідролази розчиняються клітинні оболонки. Після цього пробірку нагрівають до 75°C, що активує протеїнази EA1, які руйнують всі білки і вивільняють НК. Наступне нагрівання до 95°C дезактивує EA1 і після цього зразок готовий для подальшого дослідження (рис. 4.5).

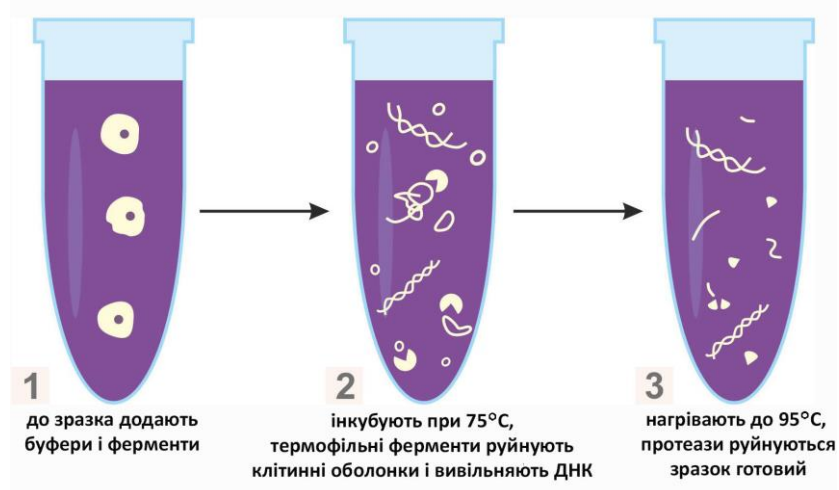


Рис. 4.5. Схема протоколу ферментативно температурно-залежного виділення.

Розглянемо детальніше **метод очищення ДНК на основі спін-колонок**.

У цьому методі для очищення ДНК використовується спін-колонка, що містить мембрани або частинки, які адсорбують ДНК, і найчастіше для цього застосовують матеріали на основі діоксиду кремнію (SiO_2), хоча можуть використовуватись і частинки іншої природи (діатомітова земля, іоннообмінні матеріали і т.д.). Адсорбція відбувається в присутності реагентів, що містять хаотропні солі (в основному, солі гуанідину) при певній рН (лужна), у процесі чи після стадії лізису. Хаотропні солі дестабілізують водневі зв'язки і гідрофобні взаємодії, денатурують білки (включаючи нуклеази) і руйнують асоціацію НК з водою, полегшуючи зв'язування ДНК з мембраною SiO_2 . Далі всі домішки і забруднення видаляють промиванням розчином, що містить детергент і/або спирт (звичайно етанол) – спирт запобігає розчиненню ДНК, дозволяючи видалити інші компоненти зразка. В кінці ДНК елюють низькосолевым буфером чи водою. В залежності від характеристик колонок пропускання проби, промивання і елювання з колонки виконують, використовуючи сили тяжіння, тиск, центрифугування чи вакуум.

Хоча всі варіанти цієї екстракції засновані на одних і тих самих принципах, комерційні набори класифікують у відповідності до джерела зразка. Компанії-розробники пропонують набори для екстракції ДНК із мікробних клітин, тканин тварин і рослин, крові, ґрунту, води і харчових продуктів. Основними відмінностями між ними є стадії попередньої обробки зразка і лізису, адаптовані до типу матриці у відповідності з їх специфічними характеристиками.

Перевагою методу є можливість концентрування НК при елюванні малими об'ємами буфера/води на кінцевій стадії протоколу. Технологія на основі колонок достатньо проста для застосування до великої кількості зразків одночасно, зазвичай забезпечуючи високий вихід, концентрацію і чистоту ДНК, дозволяючи стандартизувати обробку зразків, причому комерційні набори містять перелік можливих проблем і способи їх усунення.

До недоліків колонок, відчутних при практичному застосуванні, відносять можливість засмічення пор колонок у випадку коли зразок є в'язким чи мутним. Також до недоліків методу, як і всіх методів на основі SiO₂, відносять нездатність ефективно вилучати короткі фрагменти ДНК, оскільки вони міцно, часто незворотно зв'язуються з матрицею SiO₂.

ХІД РОБОТИ

Для роботи використовується набір для очищення геномної ДНК Monarch® NEB's, який призначений для лізису клітин, видалення РНК і очищення інтактною геномної ДНК із різноманітних біологічних зразків, включаючи культури клітин, кров і м'які тканини ссавців. Цей набір призначений також для проведення очищення клінічно значимих зразків, таких як слина та буккальні зразки з внутрішньої частини ротової порожнини в області щоки.

Очищення геномної ДНК складається з двох етапів:

- 1) лізис (англ. lysis) зразка;
- 2) зв'язування (англ. binding), промивання (англ. washing), елюція (англ. eluting) та зберігання (англ. storing) геномної ДНК.

Лізис зразка:

1. Перенесіть 100 мкл цільної крові в мікропробірку типу епандорф (об'ємом 1,5-2 мл).
2. Окремо приготуйте у мікропробірці типу епандорф суміш з трьох реагентів (100 мкл *Blood Lysis Buffer* – буфер на основі хлориду амонію для лізису еритроцитів; 10 мкл *Proteinase K* – серинова, ендолітична протеаза, яка розщеплює (перетравлює) білки, інактивує нуклеази; 3 мкл *RNase A* – фермент для розщеплення РНК) у розрахунку на один зразок крові. Перемішайте цю суміш (113 мкл) на вортексі.
3. Додайте підготовлену суміш з трьох реагентів до зразка з цільної крові для лізису. Перемішайте за допомогою вортексу.
4. Інкубуйте утворену суміш протягом 10-20 хвилин при 56°C у термошейкері з перемішуванням на максимальній швидкості (~1400 об/хв). В результаті отримуємо лізат крові.

Зв'язування, промивання, елюція та зберігання геномної ДНК:

1. Зніміть лізат з термошейкера і додайте до нього 400 мкл зв'язуючого буферу (англ. Binding Buffer), ретельно перемішайте кількаразовим піпетуванням (обережним перемішуванням шляхом вбирання і випускання суміші у наконечнику дозатора) або на пульсуючому вортексі. Цей буфер допоможе молекулам ДНК зв'язатися з матрицею спін-колонки.
2. Перенесіть суміш лізату з Binding Buffer (~600 мкл) у спін-колонку для очищення геномної ДНК, попередньо вставлену в пробірку для збору.
Важливо! Перенесіть цю суміш прямо на матрицю спін-колонки без потрапляння її на стінки чи кришечку. Цей крок зменшить ймовірність забруднення у виділеній ДНК.
3. Закрийте кришку спін-колонки та центрифугуйте: спочатку 3 хвилини при 1000 об/хв (повільна швидкість), щоб ДНК мала змогу приєднатися до матриці. Далі, без витягування пробірок з центрифуги, збільшіть швидкість до максимальної (> 12 000 об/хв) та центрифугуйте ще 1 хвилину для очищення мембрани від компонентів лізату, таких як білки, солі та вуглеводи. Обережно вийміть пробірки з центрифуги, а потім спін-колонку з пробірки для збору, останню викиньте разом із фільтратом.
4. Перенесіть спін-колонку в чисту пробірку для збору та додайте 500 мкл промиваючого буферу (англ. Wash Buffer) з доданим 96% етанолом для промивання геномної ДНК від залишкових забруднень. Закрийте кришечку спін-колонки та переверніть кілька разів, щоб Wash Buffer досяг кришечки та промив її. Відцентрифугуйте пробірку протягом 1 хвилини на максимальній швидкості (> 12 000 об/хв) та видаліть фільтрат із пробірки для збору. Пробірку для збору постукайте по паперовому рушнику,

щоб видалити будь-який залишковий фільтрат перед повторним використанням на наступному кроці.

5. Вставте знову спін-колонку в пробірку для збору. Знову додайте 500 мкл Wash Buffer для промивання геномної ДНК і закрийте кришку. Відцентрифугуйте протягом 1 хвилини на максимальній швидкості (> 12 000 об/хв) та видаліть фільтрат із пробірки для збору. Пробірку для збору постукайте по паперовому рушнику, щоб видалити будь-який залишковий фільтрат перед повторним використанням на наступному кроці.

6. Вставте спін-колонку знову в пробірку для збору. Додайте 60 мкл Wash Buffer для фінального промивання геномної ДНК і закрийте кришку. Відцентрифугуйте протягом 30 секунд на максимальній швидкості (> 12 000 об/хв), вийміть спін-колонку з пробірки для збору, останню викиньте.

7. Помістіть спін-колонку для очищення геномної ДНК у мікропробірку типу епендорф. Додайте 35-100 мкл попередньо нагрітого (60°C) вимиваючого буфера (англ. Elution Buffer) для елюції (вимивання) геномної ДНК у розчин, закрийте кришку та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 1 хвилини. Elution Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA) забезпечує сильний захист від ферментативної деградації та є оптимальним для тривалого зберігання ДНК. Однак можна використовувати інші буфери з низьким вмістом солі або воду без нуклеаз у залежності від наступного використання ДНК.

8. Центрифугуйте протягом 1 хвилини на максимальній швидкості (> 12000 x g), щоб елювати геномну ДНК. Спін-колонку викиньте, а мікропробірку типу епендорф з очищеною геномною ДНК використовуйте для подальших кроків (ПЛР-реакції, гель-електофорезу тощо) або зберігайте у морозильній камері при -80°C.

ЗАНЯТТЯ № 5

ТЕМА: Полімеразна ланцюгова реакція.

МЕТА: ознайомитись з методикою виконання полімеразної ланцюгової реакції.

ОБЛАДНАННЯ:

- ПЛР-ампліфікатор (термоциклер), вортекс;
- дозатори лабораторні (об'ємом 1000 мкл, 200 мкл, 10 мкл) та відповідні стерильні наконечники, мікропробірки типу епендорф (об'ємом 1,5-2 мл), мікропробірки для ПЛР реакції (об'ємом 0.2 мл), штативи для пробірок;
- халат, рукавички, захисні окуляри, маска.

МАТЕРІАЛИ І РЕАГЕНТИ: ПЛР мастер-мікс (*Taq*-ДНК полімераза, суміш чотирьох дезоксирибонуклеотидів (dNTPs), ПЛР-буфер з MgCl₂), праймери, геномна ДНК людини.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – метод штучного синтезу великої кількості копій певної ділянки ДНК *in vitro* (в пробірці, а не в організмі) на основі материнської молекули. Цей метод дозволяє швидко ампліфікувати (збільшити) *in vitro* потрібну послідовність ДНК з будь-якої вибраної ділянки генома більш, ніж у мільйон разів за умови, що хоча б частина цієї нуклеотидної послідовності відома. Винайдена в середині 1980-х років, ця методика стала революцією в молекулярній біології, оскільки дозволила отримувати копії з надзвичайно малої кількості материнської ДНК. Метод ПЛР має надзвичайно високу чутливість, що дозволяє виявляти в пробі всього одну молекулу ДНК. Саме тому ПЛР широко застосовується в молекулярному клонуванні фрагментів ДНК і синтезі генів, для скринінга (виявлення, обстеження) в геномних бібліотеках і картуванні хромосом, для виявлення мутацій у генах і внесення специфічних мутацій *in vitro* тощо.

Для ПЛР-реакції знадобляться наступні речовини (реагенти):

- **ДНК-полімераза** (*Taq*-полімераза, отримана з бактерії *Thermus aquaticus*) – термостабільний фермент, що забезпечує добудову 3'-кінця другого ланцюга ДНК згідно принципу комплементарності;

- **пара праймерів** – два синтетичні короткі одноланцюгові фрагменти (олігонуклеотиди) ДНК (15-20 базових пар нуклеотидів), які комплементарні до ділянок протилежних ланцюгів досліджуваної ДНК. Вони сконструйовані так, щоб фланкувати (охопити з країв) цільову ділянку, яку потрібно скопіювати. Тобто праймери є послідовностями, які зв'язуються з ланцюгами матричної (досліджуваної, материнської) ДНК на краях ділянки, яку необхідно викопіювати і тому їхні 3'-гідроксильні кінці після приєднання до ланцюгів матричної ДНК повинні бути орієнтовані назустріч один одному;

- **суміш чотирьох дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTPs)**, які є «будівельним матеріалом», що використовується ДНК-полімеразою для синтезу другого ланцюга ДНК;

- **ПЛР-буфер з $MgCl_2$** , який забезпечує оптимальні умови для реакції, а також стабільне значення рН;

- **ДНК-матриця** – підготовлений до внесення в реакційну суміш препарат, який містить ДНК будь-якого організму, копії якої потрібно дослідити.

Компоненти реакції змішуються в пробірках, які переносяться в ПЛР-ампліфікатор, що забезпечує циклічне автоматичне нагрівання і охолодження пробірок у визначений час для успішного перебігу реакції (рис. 5.1).

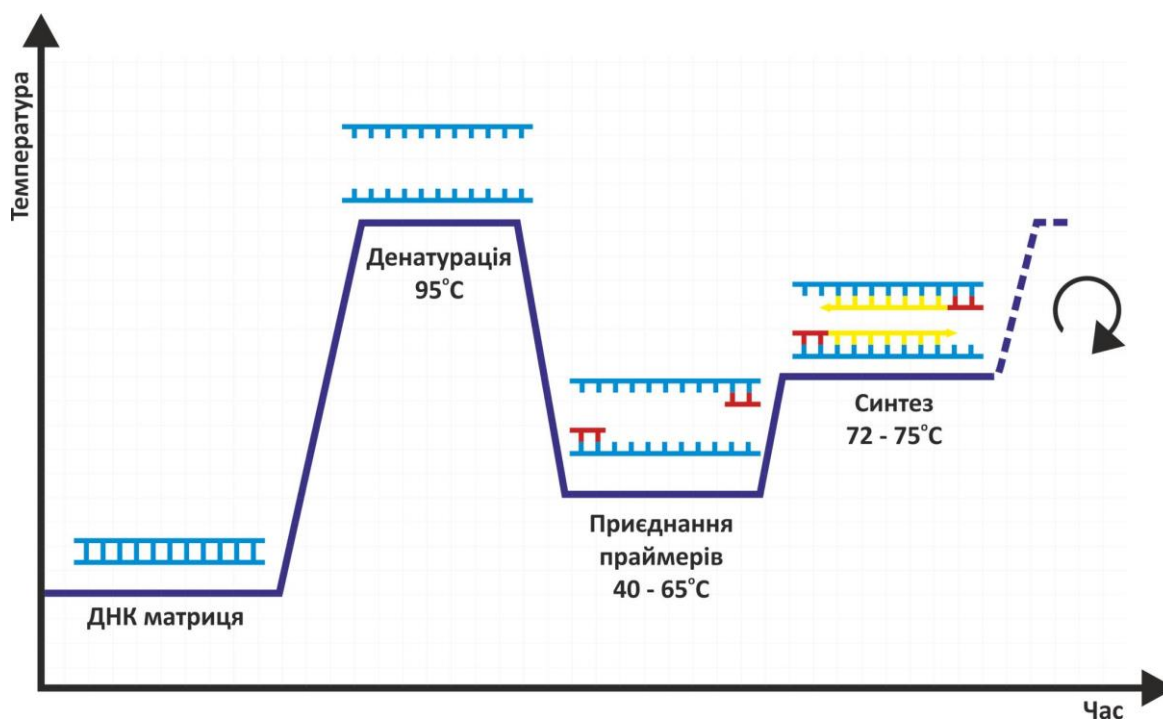


Рис. 5.1. Схематичне зображення циклу ампліфікації методом ПЛР. Цикл стандартної ПЛР-реакції.

В процесі реакції ампліфікації ДНК з нею відбувається ряд подій, які забезпечуються певними температурними циклами. Основні стадії ПЛР реакції (рис. 5.1):

1. **Денатурація** (англ. *denaturation*) – розділення подвійного ланцюга ДНК на два одноланцюгові, внаслідок розриву водневих зв'язків між комплементарними парами нуклеотидів під впливом високих температур (95°C).

2. **Приєднання праймерів** (англ. *primer annealing*). Повільне охолодження одноланцюгової ДНК до температури 40-65°C у присутності великої кількості двох

синтетичних олігонуклеотидів-праймерів (прямого і зворотного) призводить до специфічної гібридизації цих олігонуклеотидів-затравок із комплементарними ділянками послідовностей ланцюгів досліджуваної геномної ДНК. До кожного з цих ланцюгів приєднується по праймеру, які є комплементарними до конкретного місця на геномній ДНК-матриці (рис. 5.2). Така специфічність забезпечується достатньо короткою довжиною праймера (20 базових пар), що зменшує шанс приєднання до іншого місця в геномі. Праймери підбирають так, що вони обмежують потрібний фрагмент і комплементарні протилежним ланцюгам ДНК.

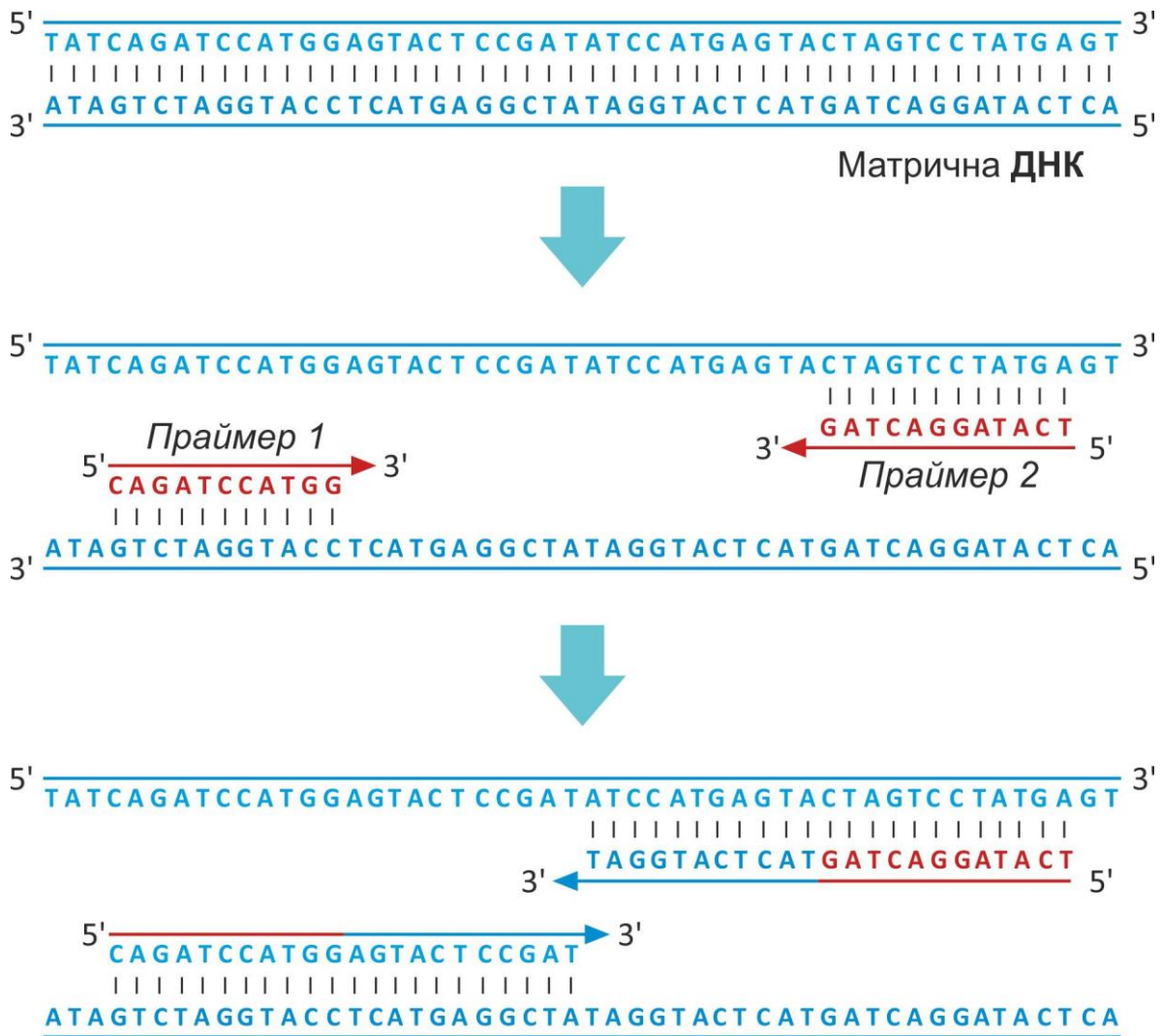


Рис. 5.2. Денатурація ДНК, приєднання праймерів до ланцюгів матричної ДНК та початок синтезу нового ланцюга.

3. Синтез нового ланцюга (англ. *extension*). Реакційну суміш із ДНК далі нагрівають до температури 72-75°C та інкубують з термостабільною *Taq* ДНК-полімеразою та сумішшю з великої кількості чотирьох вільних дезоксинуклеотидтрифосфатів. *Taq* ДНК-полімераза при цій, оптимальній для неї температурі, синтезує ті ділянки обох ланцюгів ДНК, які розташовані в 5'-3' напрямку від кожного праймера-затравки. Новосинтезовані дві молекули ДНК складаються з подвійного ланцюга, в якому на одному кінці знаходиться 5'-кінець праймера, за яким йдуть нуклеотиди, додані через продовження праймера ДНК-полімеразою (рис. 5.2, 5.3).

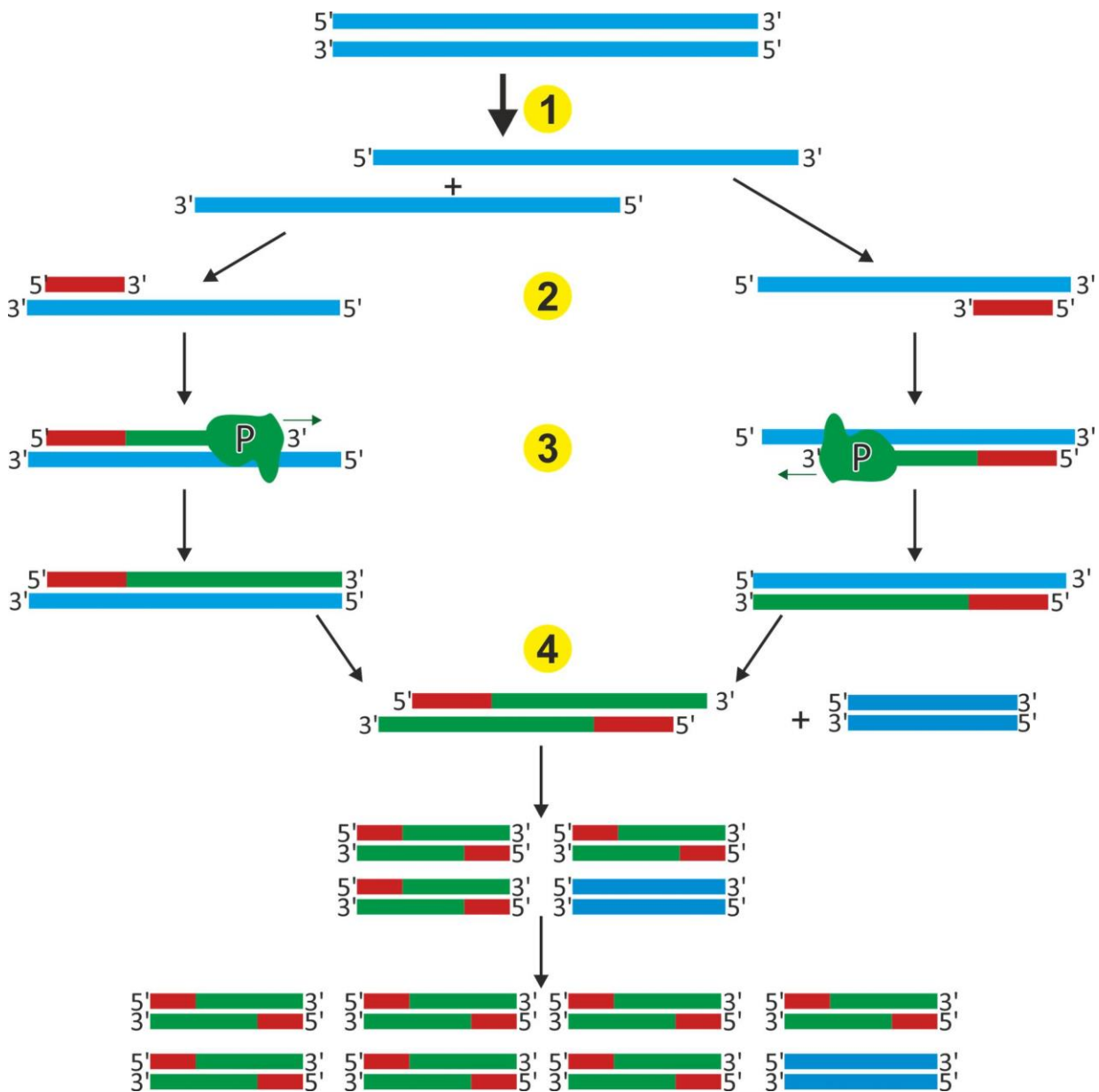


Рис. 5.3. Схема ПЛР: 1. Розділення комплементарних ланцюгів (денатурація) при 94-96°C; 2. Приєднання відповідних праймерів (олігонуклеотидних затравок) при специфічній для них температурі; 3. Синтез ДНК (елонгація) при 72-75°C. 4. Завершення першого циклу ПЛР. Два синтезовані ланцюги ДНК є матрицею для другого циклу ПЛР, що веде до подвоєння кількості ДНК у кожному наступному циклі (кількість ланцюгів, починаючи з одного праймера і закінчуючи послідовністю, комплементарною другому праймеру зростає).

Для ефективної ампліфікації потрібного фрагмента матричної ДНК, який розміщений між праймерами-затравками потрібно цей процес (нагрівання і денатурації дволанцюгової ДНК, наступне охолодження з приєднанням праймерів-затравок, знову нагрівання і синтез ланцюгів, починаючи від праймерів) *циклічно повторити 25-30 разів* (кожний із них триває біля 3-5 хв.). При цьому кожна новосинтезована ДНК слугує матрицею для подальшого синтезу. Тому в кожному наступному циклі кількість копій фрагмента подвоюється. Тобто під час повторення циклів нагрівання і охолодження продукти ДНК, зв'язані з праймерами, збільшуються в геометричній прогресії: кількість копій подвоюється на кожному циклі (тобто 2, 4, 8, 16 і т.д.). Через це весь цей процес

називають *ланцюговою реакцією*, що призводить до утворення мільйонів копій ділянки початкової ДНК, обмеженої праймерами.

Слід зауважити, що в першому циклі ПЛР кожен з новосинтезованих ланцюгів (їх ще називають «довгі матриці») є набагато довшим, ніж відстань від 3'-гідроксильної групи відповідного праймера до останнього нуклеотида послідовності, комплементарної другому праймеру. Ці ланцюги є матрицями у другому циклі ПЛР, коли двохланцюгову ДНК (яка вже складається з вихідного і новосинтезованого ланцюгів) знову піддають денатурації, а потім до неї знову приєднують праймери. Знову відбувається синтез «довгих матриць» на вихідних ланцюгах, але, що важливо, в реакційній суміші утворюється і деяка кількість «коротких матриць» (з праймерною послідовністю на одному кінці і з комплементарною другому праймеру послідовністю на іншому кінці), які синтезовані на «довгих матрицях». До останнього циклу число «коротких матриць» (синтезованих на «довгих матрицях», а також вже і на власне «коротких матрицях» в 10 перевищує число вихідних ланцюгів і «довгих матриць». Така кількість ДНК достатня для візуальної реєстрації результатів ПЛР після електрофорезного розділення продуктів реакції в агарозному гелі.

Таким чином, процес ПЛР складається з трьох основних кроків: денатурація ДНК при високій температурі, гібридизація (приєднання) праймера при низькій температурі та синтез нової ДНК як подовження праймера при проміжній температурі. Результатом є продукт, який майже повністю складається з конкретної послідовності ДНК.

ХІД РОБОТИ:

1. Розморозьте робочий розчин для ПЛР, який містить нуклеотиди, буферний розчин з $MgCl_2$, ДНК-полімерази (англ. *PCR-master mix*, 10X). Розрахуйте кількість цього розчину на кількість зразків ДНК згідно інструкції виробника та перенесіть у стерильну мікропробірку типу епандорф об'ємом 1.5 мл для подальшого змішування з праймерами.

2. Праймери синтезуються в комерційних лабораторіях і в сухому вигляді надсилаються замовнику. Надалі їх розчиняють в ультраочищеній воді до початкової (стокової) концентрації 100 μM . Для визначення пропорції води і праймера використовують молярну масу вказану на пробірці. До прикладу, якщо на пробірці вказано 38,2 нмоль праймера, то 100 μM розчин праймера утворюється шляхом додавання 382 мкл води. Надалі, праймер розводиться до робочої концентрації 10 μM шляхом змішування 10 мкл стокового розчину і 90 мкл води.

До робочого розчину додайте відповідну кількість прямого та зворотного праймера (зазвичай 1 мкл 10 μM праймера на зразок ДНК) та перемішайте піпетуванням.

3. Розділіть цю суміш у стерильні тонкостінні пробірки для ПЛР-реакції (об'ємом 0,2 мл).

4. Розведіть зразки ДНК до потрібної концентрації відповідно до протоколу виробника *PCR-master mix* та додайте їх до відповідних пробірок із робочим розчином.

5. Підготуйте ПЛР-ампліфікатор: спочатку встановіть програму, вказавши необхідні параметри температури та часу. Керуйтеся протоколом виробника.

6. Розмістіть пробірки у лунках ПЛР-ампліфікатора.

7. Запустіть циклічний процес зміни температури, який послідовно запускає та повторює температуру для денатурації (95°C – 3-4 хв. (первинне плавлення ДНК), 95°C – 30-60 с (плавлення ДНК)), приєднання праймерів (40-65°C – 30-45 с, температура розраховується по послідовності праймера) та синтез нової ДНК (72-75°C – 1 хв, час елонгації розраховується виходячи з довжини фрагмента, що синтезується).

8. По закінченню процесу, вийміть пробірки з термоциклера і продовжіть вивчення ампліконів за допомогою гель-електрофорезу або перенесіть для зберігання у морозильну камеру.

ЗАНЯТТЯ № 6

ТЕМА: Аналіз ДНК методом електрофорезу в агарозному гелі.

МЕТА: ознайомитись з методом горизонтального електрофорезу ДНК в агарозному гелі.

ОБЛАДНАННЯ:

- камера (форма) для горизонтального гель-електрофорезу, кювет (пластинка) для заливки гелю, блок живлення, електроди, типові гребінки для створення лунок, транселюмінатор (ультрафіолетовий лайтбокс), що використовується для візуалізації ДНК;

- мікропробірки типу епендорф (об'ємом 1,5-2 мл), штативи для пробірок, дозатори змінного об'єму та наконечники з фільтрами до них;

- халат, рукавички.

МАТЕРІАЛИ І РЕАГЕНТИ: 50X буфер TAE (трис-ацетат-ЕДТА), агароза, дистильована вода, барвник (SYBR® Safe DNA Gel Stain), завантажуючий буфер (Thermo Scientific 6X TriTrack DNA Loading Dye), ДНК-маркер (DNA ladder).

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Для візуалізації результатів операцій, які проводять із ДНК, таких як виділення, рестрикція, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), молекулярне клонування, найчастіше використовують електрофорез.

Електрофорез – метод розподілу макромолекул (в т.ч. молекул і фрагментів ДНК), що відрізняються за розмірами (або молекулярною масою), просторовою конфігурацією, вторинною структурою та електричним зарядом. Принцип його полягає в наступному: макромолекули, що знаходяться в буферному розчині, мають певний сумарний електричний заряд, величина і знак якого залежать від рН середовища. Якщо через буферний розчин, який знаходиться в каналі з ізолюючого матеріалу (гелю), пропускати електричний струм, то вздовж каналу встановиться певний градієнт напруження, тобто сформується електричне поле. Напруженість цього електричного поля вимірюється різницею потенціалів по кінцях каналу, відносно до довжини цього каналу (В/см). Під дією поля макромолекули відповідно до свого сумарного заряду мігрують у напрямку катода або анода. Швидкість руху макромолекул залежить від величини заряду, розмірів і тертя навколишнього середовища. Поступово вихідний препарат, що складається з різних молекул, поділяється на зони (фракції) однакових молекул, що мігрують з однаковою швидкістю. У сучасних приладах робочий канал заповнюють гелем, що має структуру сітки, яка вносить важливу додаткову деталь у електрофоретичну міграцію молекул. Фракціоновані молекули стикаються з нитками полімеру, яка утворює сітку гелю, що знижує (гальмує) швидкість руху молекул. Перешкоди для міграції стають особливо серйозними, якщо середній розмір просторових комірок гелю виявляється однаковим з розмірами макромолекул. У цьому випадку вирішальний вплив на електрофоретичну рухливість різних макромолекул та ступінь розподілу має співвідношення їх лінійних розмірів. У деяких випадках можлива ситуація, коли особливо великі молекули білків або нуклеїнових кислот взагалі не можуть «протиснутися» через пори гелю і їхня міграція припиняється.

На сьогодні використовують поліакриламідний гель (ПААГ) для розділення білків та агарозний гель для розділення нуклеїнових кислот. Варіюючи концентрацію полімеру, можна отримувати гелі з широким діапазоном розмірів пор. Крім того, можна змінювати електричні заряди макромолекул шляхом варіації рН буфера, а їхню конфігурацію шляхом введення в буфер денатуруючих агентів або детергентів. Усе це надає методу електрофорезу виняткову гнучкість.

У процесі електрофорезу зони макромолекул залишаються невидимими, тому у гель додають флюоресцентний барвник, молекули якого вбудовуються (інтеркалюють) в молекули ДНК. Барвник також пересувається в електричному полі, але вже у вигляді

пофарбованої зони. Його підбирають так, щоб швидкість міграції найбільш рухливих макромолекул була дещо нижчою, ніж у молекул барвника.

При внесенні ДНК-маркерів та зразків використовують завантажуючі буфери, які є розчинами високої густини та дозволяють легко вводити їх у лунки гелю. Ці буфери також мають у своєму складі спеціальні барвники, які дозволяють візуально стежити за міграцією ДНК під час електрофорезу.

Після закінчення електрофорезу, який триває від 10 хвилин до години, гель переміщують на світлофільтр стандартного УФ-траслюмінатора, транслюмінатора видимого світла або лазерний сканер. Барвник починає флуоресцювати в помаранчево-червоній області видимого спектра (530 нм), при цьому стає видно ДНК.

Горизонтальний гель-електрофорез – метод дослідження, що використовується для розділення та аналізу фрагментів ДНК, РНК або білків. Цей процес відбувається у гелі, яким може бути агарозний гель для нуклеїнових кислот або поліакриламідний гель для білків. Гель-електрофорез передбачає проходження електричного струму через гель, що створює електричне поле, яке впливає на рух заряджених молекул у гелевій матриці. Гелева матриця дозволяє розділити молекули за їх розміром та зарядом.

Таким чином, електрофорез в агарозному гелі є стандартним методом для розділення, ідентифікації та очищення інтактних молекул ДНК та їх фрагментів (високомолекулярна хромосомна ДНК завжди фрагментується при ізоляції із клітини).

Електрофорез в агарозному гелі здебільшого проводять у горизонтальному напрямку, оскільки при цьому:

- 1) гель з низькою концентрацією агарози краще тримається;
- 2) виходить менше перекошування (колапс) у процесі електрофорезу;
- 3) менше спотворюються смуги ДНК.

ДНК – це слабка кислота, тому в гелі, при пропусканні струму, вона рухається до аноду («+») за рахунок негативно заряджених ортофосфатних груп (ортофосфатних залишків у нуклеотидів). Залежно від свого розміру та заряду молекули ДНК рухаються у гелі в різних напрямках або з різною швидкістю, при цьому відокремлюючись одна від одної.

Всі молекули ДНК мають однакову кількість заряду на масу. Через це процес поділу фрагментів ДНК при гель-електрофорезі відбувається виключно за їх розміром. Швидше в гелі мігрують низькомолекулярні фрагменти, великі молекули рухаються повільніше через більший опір. За допомогою електрофорезу можна побачити, скільки різних фрагментів ДНК є у зразку та їх розміри відносно один одного.

На швидкість руху ДНК у гелі в процесі електрофорезу впливають кілька факторів:

1. Концентрація агарози в гелі. Агароза – полісахарид, який утворює гелі з порами від 100 до 300 нм у діаметрі, причому розмір пор залежить від концентрації агарози у гелі. Збільшення концентрації агарози в гелі призводить до зменшення розмірів його пор. Це дозволяє за допомогою геля з різною концентрацією агарози розділяти лінійні молекули ДНК у широкому діапазоні їх розмірів, аж до 60 тис. пар нуклеотидів (п.н.).

Існує залежність довжини фрагментів ДНК, що розділяються, від концентрації агарози в гелі:

Концентрація агарози, %	0,3	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,2	1,5	2,0
Довжина фрагментів ДНК, тис. п.н.	5-60	1-30	1-20	0,8-12	0,6-10	0,5-8	0,5-7	0,4-6	0,2-3	0,1-2

2. Заряд молекули. Оскільки кожен із нуклеотидів молекули ДНК несе залишок ортофосфорної кислоти з вільною гідроксильною групою, у нейтральному і особливо в слаболужному середовищі молекула ДНК набуває негативного заряду і здатності

переміщуватись в електричному полі у напрямі від катоду (негативний електрод) до аноду (позитивний електрод). Електрофоретична рухливість молекули ДНК суттєво знижується зі збільшенням її довжини.

3. Напруженість електричного поля. Чим більша напруга, тим швидше проходить форе́з, проте надто сильна напруга нагріває буфер, а це неприпустимо. Максимальна ефективність розділення фрагментів ДНК спостерігається при напруженості (градієнт потенціалу при певній нарузі до довжини між електродами), яка не перевищує 5 В/см довжини гелю (для високоякісних або препаративних форе́зів: ~ 2 В/см, для аналітичних електрофоре́зів прийнятна якість зберігається до ~ 6 В/см).

4. Конформація ДНК також відіграє важливу роль. Лінійні молекули ДНК одного розміру рухаються в гелі з однаковою швидкістю. Проте рухливість суперспіралізованих і кільцевих молекул ДНК відрізняється від рухливості лінійних молекул того ж розміру. Таким чином, методом електрофоре́зу можна фракціонувати три форми молекул ДНК бактерій:

- суперспіралізовану (нативна молекула, стабілізована білками);
- кільцеву (неушкоджена);
- лінійну (розщеплена рестриктазою кільцева молекула).

Розділення трьох типів молекул ДНК в одному гелі виглядає наступним чином:

(-) Катод
кільцева молекула ДНК
лінійна молекула ДНК
суперспіралізована молекула ДНК
(+) Анод

Визначення розмірів фрагментів ДНК відбувається шляхом порівняння комерційно доступних фрагментів ДНК (*DNA ladder*, маркери, драбини), що містять лінійні фрагменти ДНК відомої нам довжини.

При гелі-електрофоре́зі використовується *гель* – пластина з желеподібного матеріалу. Гелі для розділення ДНК часто виготовляються з агарози – особливо чиста фракція природного лінійного полісахариду агару, який одержують з морських червоних водоростей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*), звичайний вигляд якого – сухі порошкоподібні пластівці. На молекулярному рівні гель є матрицею з молекул агарози, які утримуються разом водневими зв'язками з утворенням крихітних пор. Агароза легко плавиться при нагріванні до 95⁰С в буферному розчині (у воді з деякою кількістю солей). При виливанні розплаву у кювет та його застиганні при 50-55⁰С утворюються прозорі пружні гелі. На одному кінці кювета з гелем формують невеликі заглиблення – лунки (кишені для внесення зразків ДНК), шляхом вставки тefлонової гребінки із зубчиками в незастиглий гель та її вилученням після полімеризації пластини гелю (рис. 6.1).

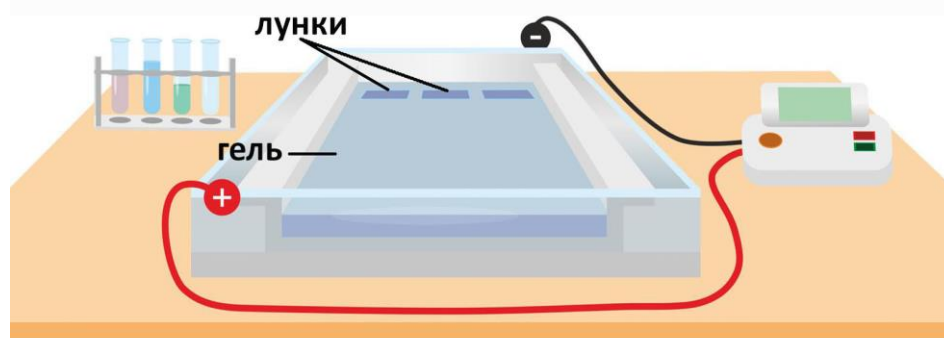


Рис. 6.1. Камера для горизонтального гелі-електрофоре́зу з гелем із лунками у кюветі.

Для візуального відстеження міграції ДНК у гелі, а також для визначення часу закінчення процесу електрофорезу використовують барвники, які додають у гель та ті, які містяться у завантажуючому буфері.

Кювет з гелем поміщають у спеціальну камеру. До одного кінця камери приєднують позитивний електрод, а до іншого кінця – негативний. Основна частина камери, де знаходиться гель, заповнена буферним розчином, що містить сіль і проводить струм. Буферний розчин повинен заповнювати камеру з гелем до рівня, при якому він трохи закриває гель.

Кінець гелю з лунками спрямований у бік негативного електрода. Кінець без лунок (до якого переміщатимуться фрагменти ДНК) розташований біля позитивного електрода.

Кожен зразок ДНК дозатором обережно переносять у лунки гелю. Одна лунка резервується для ДНК-маркера (драбини) – еталону, що містить фрагменти ДНК заздалегідь відомої довжини (рис. 6.2). Комерційні маркери ДНК є різних розмірів, тому потрібно вибрати такий, який відповідає очікуваному нами діапазону розмірів.

Камера накривається кришкою та вмикається живлення, і через гель починає проходити струм. Молекули ДНК заряджені негативно через ортофосфатні групи, в цукрово-ортофосфатному остові, починають рухатися через гель до позитивного заряду.

При цьому короткі фрагменти ДНК рухатимуться крізь гель швидше, ніж довгі. Через деякий час найкоротші фрагменти ДНК будуть ближче до позитивного електрода, а найдовші фрагменти ДНК залишаться біля лунок (рис. 6.2). Дуже короткі фрагменти ДНК можуть навіть вирватися з гелю, якщо залишити струм надовго включеним.

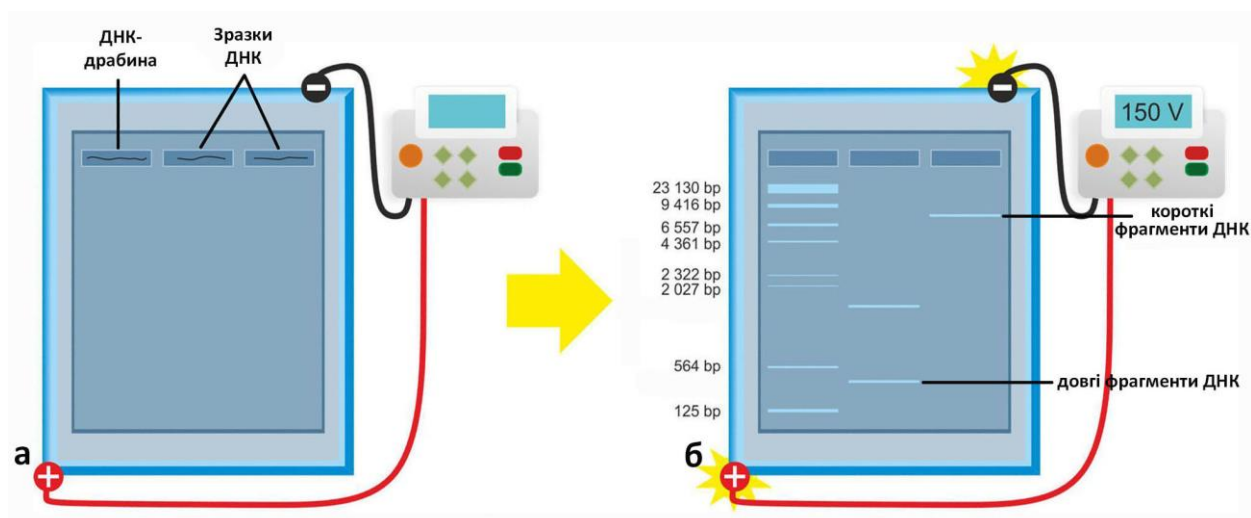


Рис. 6.2. Камера із завантаженими у лунки зразками та драбиною ДНК (а), розподіл фрагментів ДНК за розміром у гелі після підключення джерела живлення (б).

Після того, як фрагменти розділені, досліджують гель та розмір смуг у ньому. Оскільки гель фарбують ДНК-зв'язуючим барвником, то розмістивши його під ультрафіолетове випромінювання, фрагменти ДНК починають світитись, показуючи смужки молекул ДНК по всій довжині гелю.

Чітко виражена «лінія» ДНК у гелі називається смугою. Кожна смуга складається з великої кількості фрагментів ДНК однакового розміру, які разом перемістилися в одне і те ж місце. Порівнюючи смуги у зразку з ДНК-маркером, можна визначити їхній приблизний розмір.

ХІД РОБОТИ

1. Приготування робочого буферного розчину для електрофорезу.

При електрофорезі для аналізу зразків ДНК використовують різні буфери. Так, буфер ТАЕ (трис-ацетат-ЕДТА) використовують для розділення великих фрагментів (>3 кб) або суперскрученої ДНК, а буфер ТВЕ (трис-борат-ЕДТА) – для розділення коротколанцюгової ДНК. У роботі нами використовується буфер ТАЕ.

ТАЕ (трис-ацетат-ЕДТА) – буферний розчин, який містить трис (гідроксиметил) амінометана, оцтову кислоту, ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота), використовується для розділення фрагментів нуклеїнових кислот при гель-електрофорезі. Для отримання робочої концентрації 50-кратний буфер (50X ТАЕ) розводять у дистильованій воді в співвідношенні 1:49, тобто 1 мл 50X ТАЕ на 49 мл дистильованої води. Відповідно для отримання 1x ТАЕ, тобто 1 л буфера (достатня кількість для заповнення камери для електрофорезу і приготування геля), беруть 20 мл 50X ТАЕ на 980 мл дистильованої води. рН розчину при цьому повинен бути приблизно 8,3. За потреби можна скоригувати рН за допомогою 1М НСІ (кислого розчину) або 1М NaOH (лужного розчину).

2. Підготовка до роботи приладу для електрофорезу.

Прилад встановлюють строго горизонтально. В камеру наливають буфер для електрофорезу. Для формування гелевої пластини збирають кювет, у який вставляють гребінку для формування лунок у товщі геля. Гребінку виставляють так, щоб відстань від дна кювети до зубців складала 1-2 мм.

3. Приготування агарозного геля.

1 г агарози, необхідні для приготування 1%-ного геля (для 2%-ного відповідно беруть 2г агарози), переносять у конічну скляну колбу місткістю 250-500 мл, додають 100 мл робочого розчину буфера для електрофорезу і перемішують. Суспензію агарози в колбі доводять до кипіння в НВЧ-печі або на електроплитці, періодично помішуючи. Нагрівання здійснюють до тих пір, поки вміст колби не стане повністю прозорим (близько хвилини). Далі розчин охолоджують до 55-60⁰С, додають 5 мкл барвника (SYBR® Safe DNA Gel Stain), перемішують і виливають на кювет для заливки геля, рівномірно розподіляючи, уникаючи виникнення пухирців повітря, так, щоб товщина шару була не менше 5 мм, а зубці гребінок були занурені в гель не менше ніж на 3,5-4 мм. Гель повністю застигає через 15-20 хвилин. Виймають гребінки з агарозного геля легким і плавним рухом вгору, намагаючись не пошкодити утворені лунки. Кювет з готовим агарозним гелем поміщають у камеру для електрофорезу, в яку наливають робочий розчин буфера для електрофорезу так, щоб покрити гелеву пластинку шаром у 3-5 мм.

4. Підготовка до електрофорезу зразків досліджуваної і маркерної ДНК.

На парафіновій плівці готують зразки досліджуваних і маркерної ДНК, для чого їх змішують із завантажуючим буфером (Thermo Scientific 6X TriTrack DNA Loading Dye) та дистильованою водою у співвідношенні 1:1:4. Завантажуючий буфер містить спеціальні барвники, які дозволяють візуально стежити за міграцією ДНК під час електрофорезу, гліцерин (допомагає фрагментам ДНК осісти на дно лунок) та етилендіамінтетраоцтову кислоту – EDTA (зв'язує іони двовалентних металів, інгібує металозалежні нуклеази). Маркерні фрагменти потрібно використовувати такі, довжина яких приблизно рівна довжині досліджуваної ДНК.

5. Проведення електрофорезу.

В лунки застиглого агарозного гелю (під шар буфера) мікропіпеткою обережно вносять по 6 мкл зразків досліджуваної ДНК із завантажуючим буфером. У першу лунку геля вносять 6 мкл маркера молекулярних мас фрагментів ДНК. Накривають камеру кришкою і підключають його до джерела постійного струму, строго дотримуючись полярності електродів і враховуючи, що рух фрагментів ДНК відбувається у напрямі від катоду до аноду (від «мінуса» до «плюса»). На вольтметрі джерела постійного струму встановлюють напругу 120-150 В. У такому режимі процес електрофорезу триває біля 30 хвилин, орієнтуючись за рухливістю завантажуючого барвника (приблизно на 3 см). Після

закінчення електрофореза джерело напруги відключають, знімають кришку приладу, пластину агарозного геля шпалетом обережно переносять на світлофільтр УФ-трансілюмінатора для детекції. Включають трансілюмінатор. Зони ДНК зафарбовані барвником, світяться при УФ-опроміненні. Отримані результати реєструють візуально або з використанням гель-документуючої фото- чи відеосистеми.

ЗАНЯТТЯ № 7

ТЕМА: Вплив міграції та потоку генів на генетичне змішування. Популяційно-специфічні генетичні маркери. Статистичні тести в популяційній генетиці.

МЕТА: ознайомитись із поняттям міграції, потоку генів та їх впливу на генетичне змішування. Навчитись ідентифікувати популяційно-специфічні генетичні маркери та застосовувати основні статистичні тести в популяційній генетиці, використовуючи вільно доступні ресурси та інструменти.

ОБЛАДНАННЯ:

- комп'ютери з доступом до інтернет-мережі; веб-браузери (наприклад, Google Chrome, Mozilla Firefox); програмне забезпечення для роботи з електронними таблицями (наприклад, Microsoft Excel, Google Sheets); доступ до безкоштовних онлайн баз даних, пов'язаних з генетикою (наприклад, *NCBI*, *EMBL*); базове статистичне програмне забезпечення або інструменти (*R*, *Python* з відповідними бібліотеками або онлайн-статистичні калькулятори).

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Наука, що вивчає генетичний склад і особливості спадкування у популяціях, називається *популяційною генетикою*. Одним із важливих аспектів популяційної генетики є вивчення впливу міграції та потоку генів на генетичне змішування.

Міграція та потік генів. *Міграція* – процес переміщення особин у пошуках нових територій або між різними популяціями свого виду. Міграція може бути зумовлена різними причинами, такими як зміни навколишнього середовища, пошук їжі або репродуктивною метою. Коли мігранти розмножуються в інших популяціях, вони привносять нові алелі (мутації, версії генів) до місцевого генофонду (генетичного пулу – повного набору мутацій в популяції). Це переміщення алелів між популяціями називається *потокем генів*. Потік генів відіграє ключову роль у підтримці генетичного різноманіття в популяції. Перешкодження потоку генів веде до ізоляції популяції, зменшення генетичного різноманіття та може призвести до виродження.

Невипадкове спарювання – одна з еволюційних сил, яка може працювати паралельно або взаємодіяти з іншими силами, такими як природний добір, мутації та генетичний дрейф. Вибір партнера для спарювання відбувається не випадково, а на основі певних характеристик і може призвести до змін у частоті алелів в популяції і, як наслідок, до еволюційних змін. Невипадкове спарювання може бути базоване на фізичних характеристиках, соціальному статусі, близькості родичів та інших факторах.

Генетичне змішування (*admixture*). Потік генів, якому сприяє міграція, може призвести до генетичного змішування. Це процес, коли дві раніше відмінні популяції стають більш генетично схожими з часом, завдяки постійному обміну генами. Генетичне змішування має кілька наслідків:

1) *збільшення генетичного різноманіття* відбувається, коли в популяцію привносяться нові алелі. Це корисно, оскільки забезпечує популяцію ширшою генетичною основою, що дозволяє їй краще адаптуватися до змін навколишнього середовища;

2) *зменшення популяційних відмінностей* – безперервний потік генів може зменшити генетичні відмінності між популяціями, роблячи їх більш однорідними генетично. Це може бути як перевагою, так і недоліком, хоча може запобігти інбредній

депресії в менших популяціях, а також може призвести до втрати унікальних генетичних рис, які є корисними.

Гібридна потужність. У деяких випадках потомство, отримане в результаті спарювання особин із двох різних популяцій (гібридів), може демонструвати кращі якості порівняно з обома батьківськими популяціями. Це явище, відоме як гетерозис, може призвести до того, що особини мають кращу здатність до виживання і розмноження.

Специфічні генетичні маркери. Оскільки популяції розвиваються окремо, певні генетичні маркери стають специфічними для них. Це унікальні послідовності ДНК, які зустрічаються переважно в одній популяції і не виявлені, або лише зрідка трапляються в інших. Ці маркери можуть виникати через мутації, генетичний дрейф або селективний тиск, який є унікальним для певного середовища чи способу життя.

Популяційно-специфічні генетичні маркери є цінними інструментами у вивченні еволюції людини, моделей міграції та походження. Вони дозволяють вченим простежити походження популяцій, зрозуміти шляхи їхніх міграцій і навіть визначити часові рамки, коли різні популяції могли взаємодіяти.

Наприклад, наявність певного генетичного маркера в популяції в Африці та популяції в Австралії, але його відсутність у популяціях між ними, може свідчити про давній шлях міграції, який безпосередньо з'єднував ці два регіони.

Статистичні тести в популяційній генетиці. Статистичні тести використовуються в популяційній генетиці, щоб визначити чи є спостережувані генетичні відмінності між популяціями випадковими чи статистично значимими. Термін алель у даному контексті означає генетичну мутацію (варіант гена).

1. Аналіз частоти алелів.

Частота алеля означає частку або відсоток певного алеля (варіанту) у цій популяції та часто порівнюється з іншими популяціями. Ця статистика надає інформацію про генетичне різноманіття та структури популяції.

Кожний диплоїдний організм несе дві копії кожного гена, які отримані від кожного з батьків. Ці гени можуть існувати у різних формах (варіантах), які мають назву алелі гена. Частота, з якою певний алель з'являється в популяції, може дати уявлення про еволюційні сили, що діють на цю популяцію (рис. 7.1).

Частота алеля обчислюється наступним чином:

$$\text{Частота алеля (p)} = \frac{\text{кількість копій даного алеля в локусі}}{\text{загальна кількість копій всіх алелів в локусі у популяції}}$$

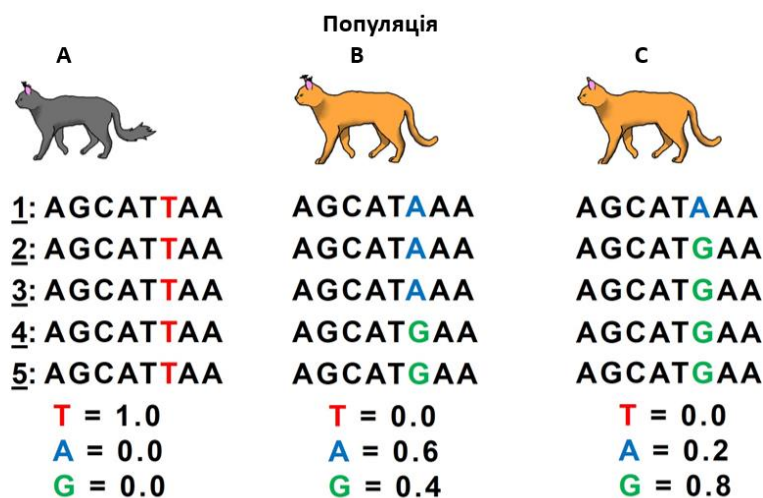


Рис. 7.1. Частоти алелів у різних популяціях. Визначте, який фенотип детермінований алелем Т?

Для біалельного гена (гена з двома алелями, А і а), якщо p є частотою алеля А, то частота алеля а дорівнює: $q = 1 - p$.

Значення вивчення алельних частот полягає в наступному:

- частоти алелів можуть змінюватися з часом через різні еволюційні сили, такі як мутаційний процес, природний добір, генетичний дрейф і потік генів;
- стабільна частота алелів протягом поколінь свідчить про те, що популяція перебуває в генетичній рівновазі, тоді як зміни можуть свідчити про те, що популяція еволюціонує;
- моніторинг частоти алелів може допомогти ідентифікувати гени, які підлягають відбору. Наприклад, раптове збільшення частоти певного алеля може вказувати на те, що він надає переваги для виживання.

2. Закон Харді-Вайнберга.

Закон Харді-Вайнберга – принцип, згідно з яким частоти алелів і генотипів (тобто комбінацій алелів) у популяції залишаються постійними від одного покоління до наступного за відсутності еволюційних впливів. Закон Харді-Вайнберга незалежно один від одного запропонували Г.Х. Харді та В. Вайнберг у 1908 році.

Умови за яких виконується закон Харді-Вайнберга:

- відсутність мутацій;
- випадкове схрещування – особини спарюються випадково, без будь-яких переваг щодо певних генотипів;
- відсутність природного відбору – усі генотипи мають рівні шанси на виживання та розмноження;
- великий розмір популяції – популяція достатньо велика, щоб запобігти випадковим коливанням частоти алелів (немає генетичного дрейфу);
- відсутність потоку генів – через міграцію в популяцію не привносяться нові алелі.

Розрахунок для біалельного гена з алелями А і а (рис. 7.2.):

- p^2 – частота гомозиготного домінантного генотипу (AA);
- $2pq$ – частота гетерозиготного генотипу (Aa);
- q^2 – частота гомозиготного рецесивного генотипу (aa).

За законом Харді-Вайнберга сума цих частот є сталою: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Відхилення від закону Харді-Вайнберга можуть вказувати на те, що одне або більше припущень не виконуються, що свідчить про те, що діють еволюційні сили. Цей закон забезпечує основу для багатьох статистичних методів у популяційній генетиці, таких як дослідження генетичних асоціацій.

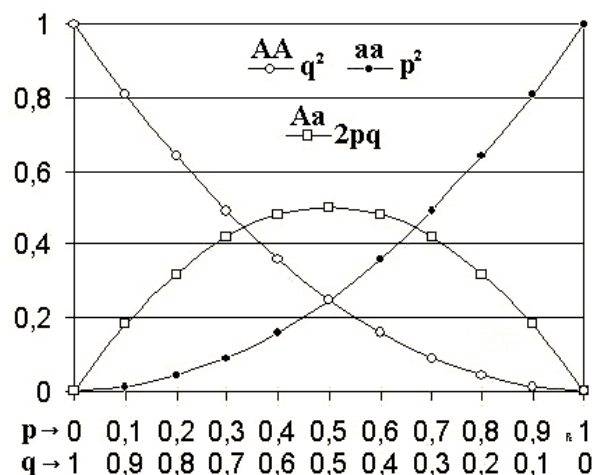


Рис. 7.2. Закон Харді-Вайнберга для двох алелів: горизонтально відкладені частоти алелів p та q , вертикально показані частоти генотипів; три можливі генотипи показані різними символами.

Аналіз частоти алелів та закон Харді-Вайнберга є базовими інструментами популяційної геноміки. Вони дають уявлення про генетичну структуру, різноманітність та еволюційні сили, що формують популяції.

ХІД РОБОТИ:

Завдання з аналізу частоти алелів:

1. Порівняльний аналіз частоти алелів у двох популяціях:

Отримайте генетичні дані (1-3 гени) та короткий опис двох різних популяцій.

- Обчисліть частоти алелів для заданого набору генів в обох популяціях.
- Порівняйте частоти алелів між двома популяціями.
- Обговоріть можливі причини будь-яких спостережуваних відмінностей, враховуючи такі фактори, як міграція, добір і генетичний дрейф.

2. Аналіз частоти алелів із часовим компонентом:

Отримайте генетичні дані (1-3 гени) та короткий опис однієї популяції, з двох різних часових проміжків (наприклад, з різницею в 50 років).

- Обчисліть частоти алелів для набору генів в обидва моменти часу.
- Проаналізуйте та обговоріть зміни в частотах алелів із плином часу.
- Обговоріть інформацію про потенційні еволюційні чи екологічні фактори, які могли спричинити ці зміни.

Завдання по закону Харді-Вайнберга:

3. Закон Харді-Вайнберга в контрольованій популяції:

Отримайте дані про частоту генотипів у популяції.

- Використовуючи надані дані, визначте чи знаходиться популяція в рівновазі Харді-Вайнберга.
- Обговоріть результати та важливість припущень принципу Харді-Вайнберга.

4. Вплив не випадкового спарювання на рівновагу Харді-Вайнберга:

Отримайте генетичні дані популяції, яка, як відомо, практикує не випадкове спарювання (наприклад, певні популяції тварин з альфа-самцями).

- Обчисліть частоти генотипу та визначте чи знаходиться популяція в рівновазі Харді-Вайнберга.
- Обговоріть як не випадкове спарювання може порушити рівновагу та потенційний довгостроковий вплив на генетичне різноманіття популяції.

5. Рівновага Харді-Вайнберга в людських популяціях:

Отримайте дані про частоту генотипу певної генетичної ознаки або захворювання в людській популяції (наприклад, кістозний фіброз або серповидно-клітинна анемія).

- Визначте чи знаходиться популяція в рівновазі Харді-Вайнберга за цією ознакою чи хворобою.
- Обговоріть потенційні фактори, які можуть вплинути на статус рівноваги, такі як добір, міграція або мутація. Подумайте про наслідки для громадського здоров'я та лікування захворювань.

ЗАНЯТТЯ № 8

ТЕМА: Генетичні складові у спадкових та негенетичних захворюваннях. Бази даних з медично важливих мутацій. Робота з інструментами для дослідження варіацій геномів.

МЕТА: ознайомитись із фундаментальними поняттями генетичних компонентів спадкових і негенетичних захворювань, із ключовими базами даних медично важливих мутацій, отримати практичний досвід роботи з вільно доступними інструментами для вивчення варіацій геному.

ОБЛАДНАННЯ:

- комп'ютери з доступом до мережі-інтернет; веб-браузери (наприклад, *Google Chrome, Mozilla Firefox*); доступ до публічних генетичних баз даних (наприклад, *NCBI, OMIM, ClinVar*).

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Генетичні фактори відіграють важливу роль у формуванні захворювань, як спадкових, так і негенетично обумовлених. Поглиблене розуміння генетичних компонентів захворювань полягає не лише у визначенні окремого гена чи мутації, а й у розкритті складного типу їх взаємодій, шляхів і регуляторних механізмів.

1. Спадкові захворювання.

Спадкові захворювання, які часто називають генетичними захворюваннями, є розладами, викликаними аномаліями в молекулах ДНК людини. Ці аномалії можуть бути невеликими, як зміна одного нуклеотиду, або масштабними, як хромосомна перебудова.

Моногенні розлади – спричинені мутаціями в одному гені та зазвичай успадковуються за простим менделівським типом. Приклади:

- кістозний фіброз – спричинений мутаціями в гені *CFTR*, що призводить до утворення густого та липкого слизу в легенях та інших органах;
- серповидно-клітинна анемія – результат односторонньої мутації в гені *HBB*, що змінює форму еритроцитів та призводить до закупорки кровоносних судин та анемії;
- хвороба Хантінгтона – викликається розширеним повтором *CAG* у гені *HTT*, що призводить до прогресуючого пошкодження нервових клітин.

Полігенні розлади – захворювання або стани, спричинені взаємодією декількох генів, зазвичай у комбінації з факторами оточуючого середовища. У таких розладах неможливо просто визначити один ген, як це відбувається у моногенних розладах. Спадковість та експресія полігенних розладів часто є складнішими і менш передбачуваними. Приклади:

- цукровий діабет 2-го типу – розвивається на фоні взаємодії численних генів, які впливають на інсулінову чутливість та секрецію, а також на фактори середовища, такі як харчування і рівень фізичної активності;
- шизофренія – може бути зумовлена взаємодією кількох генів, які впливають на нейротрансмітери в мозку, а також психосоціальними факторами;
- ожиріння – інший приклад полігенного розладу, де декілька генів може взаємодіяти з дієтологічними та фізичними факторами, викликаючи надмірний набір ваги.

Хромосомні розлади – виникають через зміни кількості або структури хромосом. Приклади:

- синдром Дауна (зайва хромосома 21);
- синдром Тернера (відсутня або частково відсутня X-хромосома у жінок).

2. Неспадкові захворювання з генетичними компонентами.

Незважаючи на те, що багато захворювань не передаються безпосередньо спадково, у основі багатьох захворювань є генетичні мутації, які збільшують ризик цих захворювань. Ці захворювання часто є наслідком поєднання дії генетичних факторів і факторів навколишнього середовища. Багато генетичних схильностей до захворювань можуть бути пом'якшені або посилені факторами навколишнього середовища та способу життя. Наприклад, людина з генетичною схильністю до раку легень суттєво підвищить свій ризик, якщо почне курити.

Онкологічні захворювання – хоча це неспадкове захворювання в традиційному розумінні, певні мутації можуть значно підвищити ризик розвитку специфічних видів онкології. Наприклад:

- мутації *BRCA1* і *BRCA2* – жінки з цими мутаціями мають вищий ризик розвитку раку молочної залози та яєчників;

- мутації APC – підвищують ймовірність виникнення в людей сімейного аденоматозного поліпозу, передвісника колоректального раку.

Комплексні розлади – такі хвороби, як хвороби серця, діабет і хвороба Альцгеймера, не мають однієї генетичної причини. Натомість вони є результатом поєднання генетичних факторів, факторів навколишнього середовища та способу життя. Зазвичай декілька генів відіграють роль у розвитку захворювання, кожен з яких приносить лише невеликий внесок у загальний ризик.

3. Бази даних медично важливих мутацій.

В епоху геноміки бази даних стали цінними джерелами генетичної інформації. Вони каталогізують мутації, пов'язані з ними захворювання та їх клінічне значення.

Бази даних:

- **dbSNP** (база даних однонуклеотидних поліморфізмів) – це безкоштовне загальнодоступне сховище, куратором якого є Національний центр біотехнологічної інформації США (NCBI). Вона служить повним каталогом для широкого діапазону генетичних варіацій, з основним фокусом на однонуклеотидних поліморфізмах (SNP). Крім простої каталогізації цих варіацій, dbSNP надає цінні анотації, які включають функціональні наслідки варіантів, їх частоту в різних популяціях і посилання на відповідну літературу. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

- **база даних про мутації генів людини (HGMD)** – повна колекція мутацій зародкової лінії в ядерних генах, які лежать в основі спадкових захворювань людини або пов'язані з ними. Містить детальну інформацію про природу мутацій, їх локалізацію та клінічні наслідки. <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

- **dbNSFP** (база даних функціональних прогнозів несинонімічних однонуклеарних (SNP) варіантів) – це спеціалізована база даних, яка збирає функціональні прогнози та анотації для несинонімічних або помилкових SNP людини. Ці SNP, які призводять до змін амінокислот у білках, що потенційно може змінити функцію білка. dbNSFP агрегує дані з кількох інструментів обчислювального прогнозування, дозволяючи дослідникам оцінити потенційний функціональний вплив конкретного SNP. <https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP> та <http://database.liulab.science/dbNSFPconn>

- **ClinVar** – вільнодоступний публічний архів, що служить центром для інформації про клінічне значення генетичних варіантів. ClinVar збирає та обробляє дані з багатьох джерел, включаючи клінічні випробувальні лабораторії, науково-дослідні установи та групи експертів, надаючи комплексне уявлення про взаємозв'язок між генетичними варіаціями людини та їхніми наслідками для здоров'я. Кожен варіант у ClinVar пов'язаний із певним клінічним значенням, такими як «патогенний», «ймовірно патогенний», «доброякісний» або «невизначений», що допомагає медикам і дослідникам у інтерпретації потенційного впливу цих варіантів на здоров'я та захворювання. Крім того, ClinVar інтегровано з іншими базами даних NCBI, забезпечуючи користувачам доступ до багатого контексту, включаючи посилання на літературу, дані про частоту популяції та функціональні анотації. ClinVar є ключовим ресурсом для розуміння клінічних наслідків генетичних варіацій. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

Таким чином, вивчення генетичних компонентів хвороб постійно розвивається. З швидким прогресом геноміки та біоінформатики розуміння генетичної основи захворювань продовжуватиме зростати. Оскільки світ йде до ери персоналізованої медицини, ці знання будуть корисними для розробки цільових терапевтичних стратегій і профілактичних заходів.

ХІД РОБОТИ:

1. Навігація базою даних NCBI:

- Почніть із доступу до бази даних NCBI. Витратьте деякий час на узагальнення, згадайте різні доступні ресурси та інструменти.

- Дослідіть ген *BRCA1*. Вивчіть його генетичну інформацію, супутні захворювання та відомі мутації.
- Підготуйте звіт про свої знахідки, відзначаючи будь-яку цікаву або несподівану інформацію, яку зустрінете.

2. Вивчення медично важливих мутацій:

- Відкрийте базу даних *ClinVar*.
- Виберіть три захворювання, які вас цікавлять та знайдіть відповідні генетичні мутації.
- Для кожного захворювання занотуйте не більше двох мутацій, гени з якими вони пов'язані, їх розташування в геномі та клінічне значення.
- Підготуйте короткий звіт до кожного захворювання, де опишіть 2 мутації, які ви обрали.

3. Дослідження варіації геному:

- Використайте мутації з попереднього завдання.
- Перейдіть до браузера генома *ENSEMBL* оберіть людський геном останньої версії.
- Використайте інструменти браузера, щоб візуалізувати генетичні варіації в цьому регіоні геному.
- Використайте популяційний інструмент *ENSEMBL* та дослідіть поширення мутацій у світі.
- Додайте до звіту популяційну інформацію щодо розповсюдження даних мутації у світі

4. Приклад із генетичних захворювань:

- Отримайте індивідуальний звіт генетичного дослідження пацієнта, що містить 100 мутацій.
- Використовуючи попередньо вивчені бази даних – надайте короткий (не більше сторінки) звіт про стан здоров'я пацієнта, його ризики та клінічні мутації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Біоснови (Климковський і Купер) / із сайту: ukrayinska.libretexts.org
2. Введение в генетику, биоинформатику, ДНК-технологии, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика / Под редакцией проф. Т.Т Глазко. – К.: КВІЦ, 2003. – 640с.
3. Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Топчій Н.М., Черненко К.Д. Генетика. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 412 с.
4. Дослідження молекулярної клітинної біології (О'Коннор) / із сайту: ukrayinska.libretexts.org
5. Запорожан В.М., Бажора Ю.І., Шевеленкова А.В., Чеснокова М.М. Медична генетика: підручник для вузів. – Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2005. – 260 с.
6. Класична генетика / із сайту: ukrayinska.libretexts.org
7. Молекулярна біологія: підручник / А.В. Сиволоб. – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. – 384 с.
https://biomed.knu.ua/images/stories/Kafedry/Genetika/Biblioteka/Molekul_biol_site/MolBiol_sivolob.pdf
8. Молекулярна генетика та технології дослідження геному: навч. посіб. / М.І. Гиль, О.Ю. Сметана, О.І. Юлевич [та ін.]; за ред. проф. М.І. Гиль. – К.: Гельветика, 2019. – 320 с.
9. Основи молекулярної біології та біоінформатики: комп'ютерний практикум [Електронний ресурс] : навч. посіб. для студ. спеціальності 122 «Комп'ютерні науки та інформаційні технології спеціалізації «Інформаційні технології в біології та медицині» / С.В. Кисляк, Є.А. Настенко; КПІ ім. І. Сікорського. – Електронні текстові дані. – Київ: КПІ ім. І. Сікорського, 2018. – 95 с.
<https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/27529/1/molbiolbioinformatics.pdf>
10. Павліченко В.І., Пішак В.П., Булик Р.Є. Основи молекулярної біології: навчальний посібник. – Чернівці: Мед. університет, 2012. – 388 с.
11. Помогайбо В. М., Петрушов А. В. Генетика людини: навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. – К.: «Академія», 2014. – 325 с.
12. Популяційна та кількісна генетика (Coop) / із сайту: ukrayinska.libretexts.org
13. Тоцький В.М. Генетика. – Одеса: «Астропринт», 2002. – 712 с.
14. An Introduction to Genomes
15. Comparative Genomics
16. Genomics and Medicine