



ДНҚ ЗЕРТТЕУ ЖӘНЕ БӨЛІП АЛУ ӘДІСТЕРІ

Полимеразалық тізбекті реакциялар (ПТР)–ДНҚ-ны амплификациялау, яғни көшірмелеп көбейту болып табылады. Бірнеше сағат ішінде ДНҚ-ның кез-келген бөлшектерін (бір генге дейін) миллиондаған дана күйінде көбейтуге мүмкіндік береді. ПТР жүргізу үшін көбейтілетін ДНҚ фрагментінің нуклеотидтер бірізділігін күні бұрын білу қажет.

- Зерттелетін ДНҚ учаскесінің 51 және 31 ұштарының нуклеотидтер бірізділігіне сәйкес 20-30 нуклеотидтен тұратын екі олигонуклеотидтік **праймерлер (РНҚ-ұйытқы)** синтезделінеді.

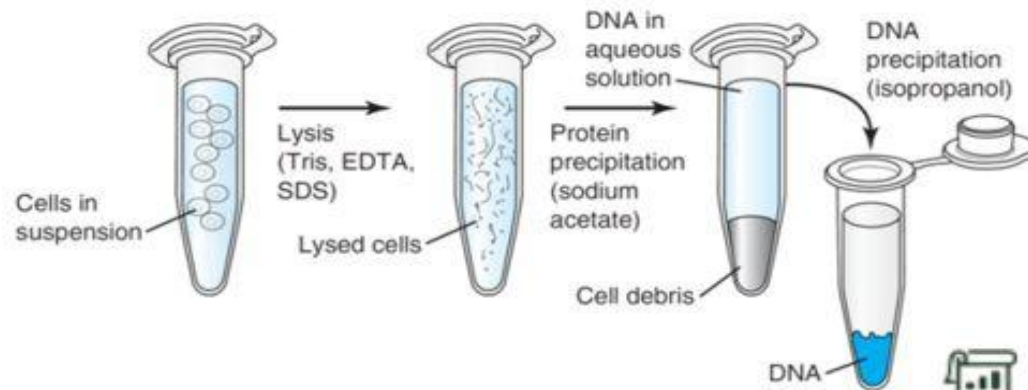
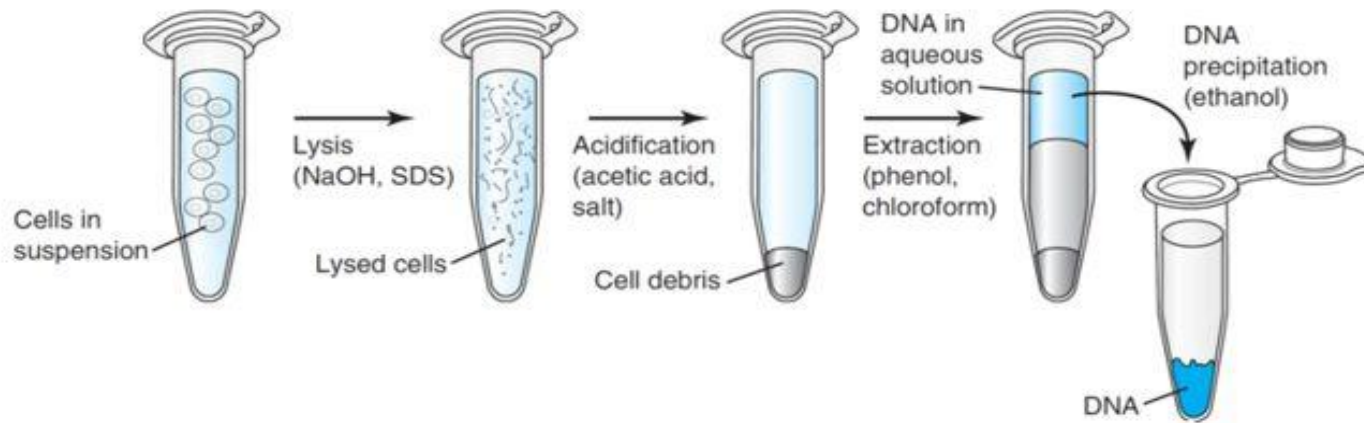


ДНҚ фрагментін **амплификациялау үдерісі** қайталанатын циклдардан тұрады. Әр бір цикл 3 сатыға бөлінеді:

- 1. Жылылықпен әсер етіп (94°) ДНҚ молекуласын **жеке-жеке тізбектерге ыдырату (денатурациялау)**;
- 2. бір тізбекті ДНҚ-ның негіздеріне **комплиментарлы праймерлерді байланыстыру (отжиг)** ($37-68^{\circ}$);
- 3. ДНҚ полимераза ферментінің қатынасуымен **жаңа ДНҚ тізбегін синтездеу (72°)**.



Выделение ДНК

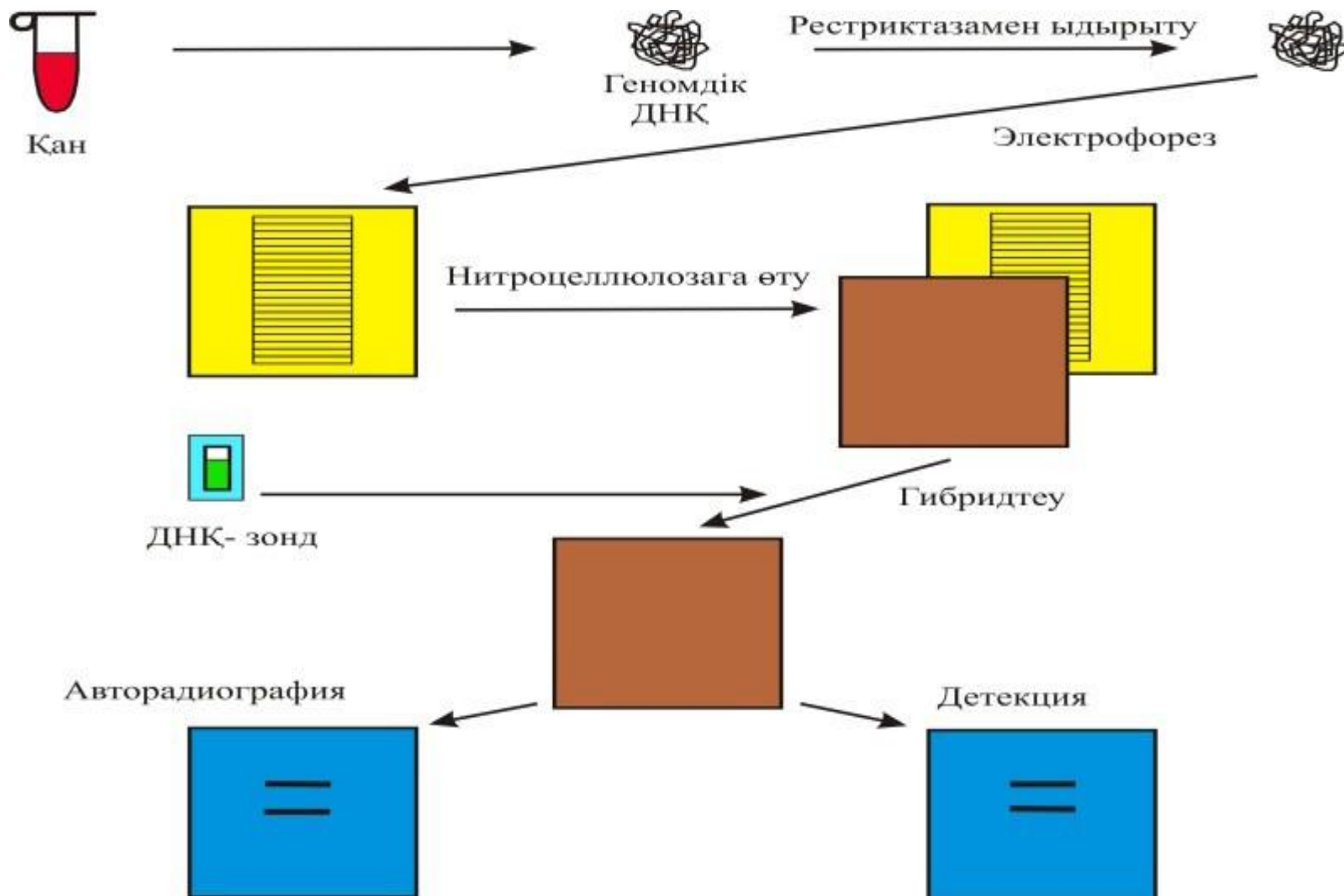


3) ДНҚ молекуласын фрагменттерге бөлшектеу (рестрикциялау)-рестриктазалар (бактерия эндонуклеазасы) арқылы ДНҚ молекуласын ұзынды қысқалы бөлшектерге (фрагмент) кесу. Рестриктазалар қос тізбекті ДНҚ молекуласының 4-6 нж нуклеотидтер бірізділігін танып кеседі де, фрагменттерге бөлшектейді.

- Геномдық ДНҚ-молекуласын рестриктазалармен әрекеттестірсек ол ұзындығы түрліше болып келетін бірнеше фрагменттерге кесіледі.



Бұл әдіс төмендегі кезеңдерден тұрады :



4) ДНҚ фрагменттерінің электрофорезі-рестриктазалар арқылы кесілген фрагменттер агрозды не полиакриламидті гель бетінде өлшемдеріне қарай түрліше таралып үлестіріледі, яғни молекула массасы үлкен фрагменттер баяу қозғалса, молекула массасы кіші –жеңіл фрагменттер тез қозғалады. Электрофорез аяқталған соң ДНҚ фрагменттері гель бетінде әртүрлі орындарда орналасады. ПТР-дан кейін ДНҚ фрагменттерін **визуальды зерттейді, ол үшін агроздық гелде электрофорез жүргізеді. Содан кейін гельді **этидий бромидімен** өңдейді. Этидий бромиді ДНҚ-мен байланысып, гель бетін ультракүлгін сәулесімен сәулелегенде, спектрдің қызыл учаскесінде жарқырау байқалады. Сол жарқыраулар зерттеуге қажет ДНҚ фрагменттері болып табылады. Адам геномы өте үлкен болғандықтан (3,2 миллиард нуклеотидтер жұбы, яғни 190 см.)рестрикция нәтижесінде көптеген рестрикция фрагменттері түзіледі және электрофорезден кейін оларды **этидий бромидімен бояғанда ультракүлгін** спектрінде ДНҚ фракцияларының бәрі біркелкі боялады. Сондықтан, ДНҚ-ның ерекше фрагменттерін бөліп алып зерттеу **Саузерннің блот-гибридтеу (будандастыру) әдісі арқылы жүргізіледі.****



1) Электрофорезден кейін гелді сілтілі ерітіндіге енгізеді, бұл кезде қос тізбекті ДНҚ молекуласы біртізбекті болып ыдырайды (яғни тізбектер арасындағы сутектік байланыс үзіледі);

- 2) ДНҚ фрагменттерін буферлік ерітінді көмегімен

нитроцеллюлозалы не нейтронды фильтрге ауыстыру. Ол үшін гель бетін фильтрмен және бір бума фильтрлеуші қағаздармен жабады. Капиллярлық эффект нәтижесінде гель бетіне перпендикуляр буферлік ерітіндіағыны пайда болады. Гельден бөлініп шыққан ДНҚ фрагменттерінің бәрі фильтрде ұсталынып қалады. ДНҚ фрагменттерінің фильтрде орналасу реті олардың гелдегі орналасуына дәлме- дәл болады.



3) ҚАЗЕТ ФРАГМЕНТТЕРДІ ВИЗУАЛЬДЫ ТАБУ ҮШІН (ФИЛЬТРДЕ ҰСТАЛЫНЫП ҚАЛҒАН ДНҚ ФРАГМЕНТТЕРІ КӨЗГЕ КӨРІНБЕЙДІ) ДНҚ ФРАГМЕНТТЕРІН РАДИОНУКЛИД НЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТТІК ТАҢБАМЕН ТАҢБАЛАНҒАН СИНТЕТИКАЛЫҚ ОЛИГОНУКЛЕОТИДТІК ЗОНД БІРІЗДІЛІГІМЕН ГИБРИДТЕЙДІ (БУДАНДАСТЫРАДЫ). ӘРБІР ЗОНД 16-30 ЖҰП НЕГІЗДЕРДЕН ТҰРАДЫ. ЗОНД НУКЛЕОТИДТЕРІНІҢ БІРІЗДІЛІГІ ЗЕРТТЕЛУШІ ГЕНОМДЫҚ ДНҚ ФРАГМЕНТІМЕН ТОЛЫҚ НЕ ІШІНАРА КОМПЛИМЕНТАРЛЫ БОЛУЫ ҚАЗЕТ.

- 4) ТАҢБАЛАНҒАН ЗОНДЫ БАР ЕРІТІНДІМЕН ФИЛЬТРДІ ӘРЕКЕТТЕСТІРГЕНДЕ ДНҚ ФРАГМЕНТТЕРІМЕН ДНҚ-ЗОНД ТІЗБЕКТЕРІ КОМПЛИМЕНТАРЛЫ ГИБРИДТЕЛІНЕДІ (БУДАНДАСАДЫ). РАДИОАКТИВТІК ТАҢБАМЕН ТАҢБАЛАНҒАН БУДАН УЧАСКЕЛЕРІН РЕНТГЕНМЕН ЗЕРТТЕГЕНДЕ (АУТОРАДИОГРАФИЯ) ЗЕРТТЕЛУШІ ДНҚ ФРАГМЕНТТЕРІ АЙҚЫН БАЙҚАЛАДЫ.

