

ИНСТИТУТ ЛЕСА
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

В. Е. ПАДУТОВ
О. Ю. БАРАНОВ
Е. В. ВОРОПАЕВ

МЕТОДЫ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО
АНАЛИЗА

Минск
“Юнипол”
2007

Рецензенты:

Академик НАН Беларуси, д.б.н., профессор *Н. А. Картель*

Академик НАН Беларуси, д.б.н., профессор *В. Н. Решетников*

Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. **Методы молекулярно-генетического анализа.**— Мн.: Юнипол, 2007.— 176 с.: ил.

ISBN 978-985-6768-12-8.

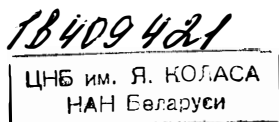
В данной работе описаны современные методы молекулярно-генетического анализа, которые применяются для решения различных проблем в биологических исследованиях. Приведенные протоколы выделения и анализа ДНК растительного, животного и бактериального происхождения апробированы и, в случае необходимости, модифицированы авторами в ходе экспериментальных работ.

Книга представляет интерес для специалистов в области молекулярной и популяционной генетики, медицины, лесного и сельского хозяйства, а также может быть использована в качестве учебно-методического пособия для студентов медицинских и биологических специальностей высших учебных заведений.

Рекомендовано к изданию

Ученым советом

Института леса Национальной академии наук Беларуси



Содержание

Введение	3
1. Технологии анализа ДНК	5
2. Методические основы	12
Выделение ДНК	12
Полимеразная цепная реакция	15
Проведение ПЦР	18
Реакционная смесь для ПЦР	18
Программа ПЦР	20
ПЦР в реальном времени	22
Рестрикция	23
Гибридизация	26
Электрофорез	28
Секвенирование	34
3. Методы анализа ДНК	36
Амплификация с произвольными праймерами	36
Амплификация со специфическими праймерами	38
ПЦР в реальном времени	41
Гибридизация	44
Комбинированные методы	45
Секвенирование	46
4. Протоколы проведения работ	47
Выделение ДНК	47
Растения	47
Выделение суммарной ДНК SDS-методом	47
Выделение суммарной ДНК ферментным методом	49
Выделение суммарной ДНК комплексным СТАВ-методом	49

Выделение суммарной ДНК упрощенным	
СТАВ-методом	51
Выделение суммарной ДНК щелочным методом	52
Бактерии	53
Выделение суммарной ДНК SDS-СТАВ методом	53
Выделение плазмидной ДНК методом щелочного	
лизиса	55
Животные	56
Выделение суммарной ДНК SDS-методом из	
биоптатов	56
Выделение суммарной ДНК из насекомых	58
Выделение суммарной ДНК с помощью мочевины	59
Выделение митохондриальной ДНК щелочным	
методом	60
Выделение суммарной ДНК из крови быстрым	
фенольным методом	62
Выделение суммарной ДНК из крови	63
Выделение ДНК из парафинизированных тканей	65
Проведение полимеразной цепной реакции	66
Состав реакционной стандартной ПЦР смеси	66
Программа ПЦР для выявления зон до 3 т.п.н.	66
Программа ПЦР для выявления зон до 150–300 п.н.	66
Программа ПЦР с “мягким” отжигом	67
Программа ПЦР для минимизации неспецифической	
амплификации	67
Программа ПЦР для полимераз, требующих	
активации	68
Состав реакционной смеси TaqMan анализа	68
Состав реакционной смеси SYBR Green анализа	68
Программа ПЦР в реальном времени	69
Программа ОТ-ПЦР в реальном времени	
(RT Real-Time PCR)	69
Состав реакционной смеси TaqMan для анализа РНК	69
Состав реакционной смеси SYBR Green для	
анализа РНК	70

Гибридизация	70
Перенос по Саузерну с использованием вакуумного блоттинга	70
Секвенирование	73
Секвенирование с применением радиоактивных меток	73
Секвенирование (на примере автоматического секвенатора ABI PRISM)	75
Электрофорез	77
Состав Трис-ЭДТА-Боратного (ТБЕ) буфера (pH 8,3)	77
Состав Трис-ЭДТА-Ацетатного (ТАЕ) буфера (pH 8,0)	77
Состав 0,8% агарозного геля	78
Состав 4% акриламидного геля	78
Состав 6% денатурирующего акриламидного геля	78
Состав 5× буфера для нанесения проб	78
Состав 6× буфера для нанесения проб	78
Процедура окраски гелей бромистым этидием	79
Процедура окраски полиакриламидных гелей нитратом серебра	79
5. Интерпретация результатов	81
6. Основное оборудование и реактивы	91
7. Возможные области применения	96
Микро- и макроэволюционные исследования	99
Популяционно-генетические исследования	105
Селекционно-генетические исследования	108
Медико-генетические исследования	112
8. Информационные ресурсы Интернета	128
Научные поисковые системы	128
Сайты, посвященные молекулярно-генетическим исследованиям	130
Коллекции анимационных учебно-познавательных фильмов	132
Вспомогательная информация	132

Базы данных по молекулярной биологии	133
Наиболее часто используемые методики в молекулярной биологии	134
Литература	138
Приложение. Рекомендации для ПЦР-лабораторий	168